

***UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI NAPOLI  
“FEDERICO II”***

**Dottorato di Ricerca  
in  
Fisiopatologia Clinica e Medicina Sperimentale  
*Indirizzo Scienze Cardiovascolari*  
XXIII ciclo**



**Tesi di Dottorato**

**Il dominio RH di GRK5 regola l'attività trascrizionale del  
fattore di trascrizione NFκB  
*in vitro* e *in vivo*:  
effetti sul cancro e sull'ipertrofia cardiaca**

**Tutor**  
Chiar.mo  
Prof. Guido Iaccarino

**Candidata**  
Dr.ssa Daniela Sorriento

Anno Accademico 2009/2010

# INDICE

## INTRODUZIONE

- La famiglia delle chinasi associate a proteina G (GRK) *p. 3*
- Il fattore di trascrizione NFκB *p. 5*
- NFκB e cancro *p. 7*
- NFκB e ipertrofia ventricolare sinistra *p. 8*

## SCOPO DELLO STUDIO *p. 10*

## METODI *p. 11*

### RISULTATI

#### Studio *in vitro*: cellule endoteliali

- *L'overespressione di GRK5 determina accumulo nucleare di IκBα* *p. 19*
- *GRK5 interagisce con IκBα* *p. 20*
- *RH è il dominio di GRK5 responsabile dell'interazione con IκBα* *p. 20*
- *GRK5-RH inibisce la trascrizione di TNFα* *p. 21*
- *GRK5-RH aumenta l'apoptosi* *p. 21*
- *GRK5-RH inibisce la migrazione e la neo-angiogenesi delle cellule endoteliali* *p. 21*

#### Valutazione degli effetti di GRK5-NT *in vivo*: Studio sui tumori

- *GRK5-NT regola il signaling di NFκB in cellule tumorali in vitro e in vivo: trattamento con l'adenovirus* *p. 23*
- *GRK5-NT regola il signaling di NFκB in cellule tumorali in vitro e in vivo: trattamento con TAT-RH* *p. 25*

#### Valutazione degli effetti di GRK5-NT *in vivo*: Studio sull'ipertrofia cardiaca

- *Studio in vitro* *p. 28*
- *Studio in vivo in ratti SHR* *p. 28*
- *Studio in vivo in ratti WKY* *p. 31*

## DISCUSSIONE *p. 32*

## BIBLIOGRAFIA *p. 36*

## LEGENDE *p. 40*

## FIGURE *p. 48*

## TABELLE *p. 60*

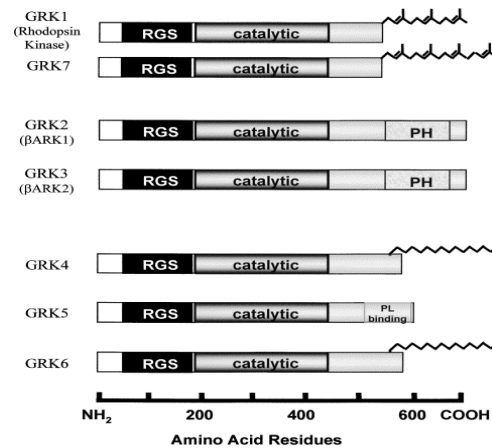
## INTRODUZIONE

### **La famiglia delle chinasi associate a proteina G (GRK)**

La famiglia delle chinasi associate a proteina G (GRK) comprende sette serina/treonina chinasi che fosforilano e regolano i recettori accoppiati a proteine G (GPCR) quando sono nella loro conformazione attiva <sup>1</sup>. La fosforilazione mediata dalle GRK avviene a livello dei loop intracellulari e/o della coda COOH-terminale del recettore e ne aumenta l'affinità di legame con le arrestine citosoliche; questo cambiamento causa due eventi: impedisce l'interazione del recettore con le proteine G per ingombro sterico e promuove l'endocitosi clatrina-dipendente del recettore inattivato all'interno dei compartimenti endosomiali, comportandone la degradazione o il riciclo <sup>2</sup>. Il complesso GPCR- $\beta$ arrestina è in grado di innescare l'attivazione di vie di trasduzione del segnale che sono alternative a quelle promosse dalla trasduzione classica, ovvero indipendenti dalle G-protein. In particolare Erk1/2, p38 MAPK e JNK possono essere attivate dal complesso recettore- $\beta$ arrestina,<sup>3</sup>; inoltre  $\beta$ -arrestina può agire da scaffold di connessione tra le GPCR attivate e la tirosina chinasi c-Src, il signaling di AKT e NF- $\kappa$ B <sup>4</sup>.

La famiglia delle GRK può essere suddivisa in 3 sottogruppi in base all'omologia di sequenza:

- 1) chinasi della rodopsina (GRK1 e GRK7);
- 2) chinasi del recettore  $\beta$ -adrenergico (GRK2 o  $\beta$ ark1 e GRK3 o  $\beta$ ark2);
- 3) sottofamiglia GRK4 (GRK4, GRK5 e GRK6).



Tutte le GRK sono espresse in maniera ubiquitaria <sup>2, 5</sup>, tranne GRK1, presente quasi esclusivamente nella retina, e GRK4, presente maggiormente nei testicoli <sup>6</sup>. La struttura di base delle GRK (immagine in alto) presenta un dominio catalitico centrale altamente conservato (circa 45% di identità di sequenza) di 263-266 amminoacidi; un dominio N-terminale moderatamente conservato, importante per il riconoscimento del recettore e l'ancoraggio alle membrane intracellulari (circa 185 amminoacidi); ed una porzione COOH-terminale poco conservata e di lunghezza variabile (105-230 amminoacidi), importante per la traslocazione agonista-mediata perché favorisce l'interazione con i lipidi <sup>7</sup>. Tutte le GRK contengono nella porzione N-terminale un dominio abbastanza conservato (circa il 27% di identità di sequenza), il dominio RH, di omologia con il regolatore del signaling delle Proteine G (RGS), che rende possibile la modulazione della trasduzione del segnale da parte delle GPCR in maniera indipendente dal meccanismo di fosforilazione ad opera delle GRK: GRK2, ad esempio, è in grado di inibire il segnale dei GPCR sequestrando la proteina G $\alpha_{q11}$  grazie proprio al dominio RH <sup>8</sup>. Le GRKs presentano una diversa distribuzione tissutale, localizzazione subcellulare e regolazione dell'attività catalitica <sup>9, 10</sup>.

Le GRK sono prevalentemente localizzate sulla membrana plasmatica <sup>11</sup>, ma recentemente è stato dimostrato che GRK5 è in grado di localizzarsi all'interno del nucleo mediante una sequenza di localizzazione nucleare (NLS) <sup>12</sup>, suggerendo una possibile funzione nucleare per questa chinasi, presumibilmente di regolazione della trascrizione genica.

### **Il fattore di trascrizione NFκB**

NFκB è un fattore di trascrizione dimerico normalmente sequestrato nel citoplasma di cellule non stimulate e deve traslocare nel nucleo per poter svolgere la sua funzione. In base al modello canonico di attivazione, il signaling di NFκB è regolato dal legame con la proteina inibitoria IκBα che maschera il suo dominio di localizzazione nucleare e previene così la sua traslocazione nel nucleo <sup>13</sup>. La stimolazione extracellulare determina la rapida fosforilazione, ubiquitinazione e degradazione proteolitica di IκBα, liberando così il dimerico NFκB, prevalentemente presente come dimerico p50/p65, che trasloca nel nucleo per attivare la trascrizione genica <sup>14, 15</sup>. In particolare, la degradazione di IκBα è catalizzata dalle kinasi inibitorie IKK, che formano un complesso macromolecolare che comprende una subunità che funziona da scaffold, IKK-γ (NEMO), e due kinasi IKK-α e IKK-β <sup>16-18</sup>. La degradazione di IκBα rilascia NFκB che trasloca nel nucleo, mediante una sequenza di localizzazione nucleare (NLS) presente nel monomero p50, e lega specifiche sequenze di DNA nelle regioni promotrici o enhancer dei geni target. NFκB è in grado di regolare la sua stessa attività poiché regola la trascrizione della sua proteina inibitoria IκBα che, una volta espressa, entra nel nucleo dove lega e spiazza NFκB dal DNA. Il complesso IκBα/NFκB è quindi portato fuori dal nucleo mediante

un meccanismo di esportazione CRM-1- dipendente e ritorna nel citoplasma in forma inattiva <sup>19, 20</sup>. Recentemente, sono stati proposti nuovi meccanismi di regolazione dell'attività trascrizionale di NFκB basati sull'interazione proteina-proteina. Infatti, è stato dimostrato che β-arrestin2, un importante regolatore di GPCR, interagisce direttamente con IκBα prevenendo così la sua fosforilazione e degradazione <sup>21</sup>. Di conseguenza, β-arrestin2 regola l'attività trascrizionale di NFκB . Oltre β-arrestin2, sono stati descritti altri partners per IκBα and NFκB. In particolare, studiando NFκB p105, un trascritto del gene di NFκB che codifica per una proteina più lunga che partecipa alla trasduzione del segnale citosolico ma è privo di attività catalitica, Parameswaran ha recentemente descritto l'abilità della chinasi GRK5 e di Arrestina-2 di interagire fisicamente con questa proteina, che è un precursore del monomero p50 di NFκB, e inibire così l'attivazione di ERK1/2 indotta dalla stimolazione con lipopolisaccaride (LPS) nei macrofagi <sup>22</sup>. NFκB regola l'espressione di diversi geni, tra i quali geni codificanti citochine (IL-1, IL-2, IL-6, IL-12, TNFα, IFN-γ), chemochine (IL-8, MIP-1α, MCP1), molecole di adesione (ICAM, VCAM, E-selectina), regolatori di apoptosi e proliferazione cellulare (c-myc, ciclina D1, BCL-X) <sup>9, 11, 15, 23-25</sup>. NFκB ha, quindi, un ruolo importante in diverse patologie, come diabete mellito tipo II e insulino-resistenza; ipertrofia cardiaca; ipercolesterolemia; aterosclerosi; insufficienza cardiaca cronica; cancro e angiogenesi <sup>10, 26-28</sup>. Quindi, la modulazione dell'attività di NFκB può rappresentare un'efficace strategia terapeutica per diverse patologie, caratterizzate da un aumento della sua attività trascrizionale.

## **NFκB e cancro**

Esistono ormai forti evidenze che correlano NFκB al cancro. La sua attività, infatti, è costitutivamente elevata in molti tipi di tumore umano come melanomi <sup>29, 30</sup>, carcinomi della tiroide <sup>31</sup> e del colon <sup>29</sup>, e la persistente attivazione in corso di infiammazione cronica predispone alla trasformazione di cellule normali in cellule neoplastiche. Secondo Hanahan e Weinberg <sup>32</sup> esistono sei alterazioni della fisiologia cellulare che caratterizzano una cellula tumorale: proliferazione autonoma, insensibilità ai segnali anti-proliferativi, resistenza all'apoptosi, invasione tissutale e metastasi, angiogenesi sostenuta, immortalità. Molti dei geni che regolano questi effetti sono sotto il controllo trascrizionale di NFκB <sup>33</sup>. Questi tumori in cui NFκB è costitutivamente attivato mostrano maggiore resistenza alla chemioterapia. Quindi, l'inibizione dell'attività di NFκB può rappresentare un'efficace strategia terapeutica per il cancro, dal momento che l'inibizione di NFκB favorisce i processi apoptotici indotti dalla chemioterapia, diminuisce l'alto tasso proliferativo che caratterizza le cellule tumorali e inibisce la metastatizzazione. Ad oggi molti ricercatori sono impegnati nella ricerca di inibitori selettivi di NFκB e molti di questi sono stati testati in cellule tumorali. Questi inibitori, però, pur essendo capaci di inibire l'attività oncogenica di NFκB, interferiscono anche con altre vie di trasduzione del segnale coinvolte nella regolazione di apoptosi e proliferazione cellulare, infiammazione e risposta immunologica, determinando quindi diversi effetti collaterali.

In questo studio, abbiamo progettato, realizzato e purificato una proteina sintetica, che riproduce il dominio RH di GRK5, e abbiamo testato la sua

capacità di inibire l'attività di NFκB e quindi la crescita dei tumori, e ne abbiamo valutato gli eventuali effetti collaterali.

### **NFκB e ipertrofia ventricolare sinistra**

Diversi studi suggeriscono un ruolo delle chinasi dei recettori associati a proteina G (GRK) nello sviluppo dell'ipertrofia cardiaca. Infatti, topi transgenici con overespressione del dominio amino-terminale di GRK2 (βARKnt) sviluppano ipertrofia cardiaca <sup>34</sup>. Inoltre, GRK5 presenta una localizzazione nucleare nei cardiomiociti di ratti spontaneamente ipertesi con scompenso cardiaco (SHHF), suggerendo che questa chinasi può essere coinvolta nella regolazione dell'espressione di geni ipertrofici <sup>35</sup>. Recentemente è stato dimostrato che il fattore di trascrizione NFκB ha un ruolo importante nella patogenesi del rimodellamento e dello scompenso cardiaco <sup>36</sup> e NFκB regola l'ipertrofia nei cardiomiociti in risposta ad agonisti dei GPCR, come Fenilefrina, Endotelina-1, Angiotensina II <sup>37, 38</sup>. Diverse strategie sono state identificate per inibire l'attività di NFκB a diversi step della sua via di trasduzione del segnale: l'inibizione farmacologica dell'attività di IKK con PDTC <sup>39</sup>, inibizione del proteosoma con MG-132 <sup>40</sup>, l'espressione mediata da adenovirus di una forma non degradabile di IκBα <sup>41</sup>. Molte di queste strategie sono state testate *in vivo* per regolare l'ipertrofia cardiaca. Un topo transgenico che overesprime un dominante negativo di IκBα con tripla mutazione nei siti di fosforilazione coinvolti nella sua degradazione (S32A, S36A, Y42F) presenta una normale morfologia cardiaca e attivazione di NFκB in risposta a citochine, e la cardiomiopatia indotta dal TNFα è completamente assente in questi topi <sup>41</sup>.



Inoltre, l'inibizione dell'attività di NFκB, ottenuta in un modello murino transgenico che presenta il knockout del gene codificante la subunità p50 di NFκB, attenua l'ipertrofia del miocardio <sup>42, 43</sup>. NFκB è il principale regolatore della produzione di citochine e delle risposte apoptotiche. È chiaro quindi che il suo effetto sulla regolazione dell'ipertrofia cardiaca dipende dalla regolazione delle risposte infiammatorie indotte dalle citochine e dalla regolazione dell'apoptosi cellulare. Tutte queste evidenze suggeriscono che il blocco di NFκB può essere un'efficace strategia terapeutica per l'inibizione dell'ipertrofia cardiaca. In questo studio abbiamo testato la capacità del dominio RH di GRK5 di inibire l'ipertrofia ventricolare sinistra mediante inibizione dell'attività trascrizionale di NFκB.

## **SCOPO DELLO STUDIO**

In questo studio abbiamo valutato il ruolo di GRK5 nella regolazione dell'attività trascrizionale di NFκB e l'effetto di questa modulazione su alcune patologie caratterizzate da un'aumentata attivazione di NFκB, il cancro e l'ipertrofia ventricolare sinistra.

## **METODI**

### **Colture cellulari**

Cellule endoteliali di aorta bovina (BAEC), cellule HEK293, cardiomioblasti (H9C2), cellule derivanti da carcinoma anaplastico della tiroide (KAT-4) sono coltivate nel mezzo di coltura “Dulbecco’s minimal essential medium” (DMEM) con aggiunta di 10% di siero bovino (FBS) a 37°C in 95% aria-5%CO<sub>2</sub>.

### **Silenziamento genico di GRK5**

La sequenza del siRNA per il gene umano di GRK5 e la procedura per il silenziamento genico sono state descritte in precedenza <sup>44</sup>.

### **Clonaggio**

I plasmidi pRK5-GRK5-WT e pRK5-GRK5-K215R (forma priva di attività catalitica) sono un dono della dott.ssa J. Pitcher (University College, London). pRK5-GRK5-WT è stato usato come template per clonare i singoli domini di GRK5 mediante PCR. p-IκBα WT è un dono del Dr. Antonio Leonardi (Università Federico II di Napoli) ed è stato usato come template per il clonaggio di IκBα-CT. I primers sono stati disegnati con l’aggiunta delle sequenze dei siti di restrizione degli enzimi Xba I e HIND III (Tabella I). Per sintetizzare una proteina che riproducesse il dominio RH di GRK5 e fosse in grado di veicolare all’interno della cellula autonomamente, abbiamo disegnato il plasmide TAT-RH, usando pcDNA3.1-GRK5-RH come template per amplificare la sequenza RH. I primers per l’amplificazione contengono i siti di restrizione per gli enzimi NCO I e KPN I (Tabella I). Gli amplificati sono stati poi clonati nel vettore pTAT-HA, dono del Dr. Steven Dowdy (Washington University School of

Medicine). Il vettore pTAT-HA comprende il dominio TAT di 111 aminoacidi, che è la sequenza minima di HIV TAT capace di entrare autonomamente nella cellula, e istidina e HA come sequenze tag.

Le sequenze amplificate dei singoli domini di GRK5 sono state purificate mediante l'utilizzo del kit "gel extraction kit" (Invitrogen) e clonato nel plasmide pcDNA 3.1 myc/his A (Invitrogen) mediante l'utilizzo di T4 DNA ligase (Promega). La trasfezione transiente nelle BAEC è stata realizzata con la Lipofectamine 2000 (Invitrogen). I plasmidi Ig-  $\kappa$ B-luciferase e RSV- $\beta$ Galactosidase sono un dono del Dr. Antonio Leonardi (Università Federico II di Napoli). L'adenovirus codificante la regione amino-terminale di GRK5 (AdGRK5-NT) che comprende il dominio RH è un dono del Dr. W.J. Koch (Jefferson University, Philadelphia). È un adenovirus bicistronico codificante la regione NT di GRK5 (aa 1-180) e la Green Fluorescent Protein (GFP) sotto il controllo di promotori CMV indipendenti. L'adenovirus vuoto (AdEmpty) o codificante Lac-Z (AdLac-Z) sono stati utilizzati come controlli negativi.

### **RT-PCR**

L'RNA totale è stato estratto mediante l'utilizzo di Trizol (Invitrogen) seguendo lo specifico protocollo. Il cDNA è stato sintetizzato mediante Thermo-Script RT-PCR System (Invitrogen). Dopo la reazione di trascrittasi inversa, la real-time (RT-PCR) è stata realizzata utilizzando il sistema della SYBR Green (Applied Biosystems) sullo strumento StepOne (Applied Biosystem). Le sequenze dei primers sono descritte in Tabella II.

### **Sintesi e purificazione della proteina TAT-RH**

I plasmidi TAT e TAT-RH sono stati trasformati in cellule batteriche BL21 (DE3) pLysS (Invitrogen) e cresciuti overnight in 2L di Luria Broth (LB). Quindi, le cellule sono trattate con Isopropylthiogalactoside (IPTG, 100  $\mu$ M, 3 ore) per indurre l'espressione della proteina. Per la purificazione della proteina abbiamo utilizzato condizioni denaturanti per raccogliere anche la proteina ricombinante dai corpi inclusi (Buffer di lisi: 8M Urea, 100 mM NaCl, 20 mM Hepes pH 8) su colonna con matrice di nichel Ni-NTA (GE Healthcare). Dopo diversi lavaggi con il buffer di lisi, la proteina ricombinante è stata eluita dalla colonna utilizzando quantità crescenti di imidazolo (100, 200 and 500 mM). Il refolding della proteina è stato realizzato mediante cambio di buffer in colonne Amicon Ultra-4 Centrifugal Filters (Millipore). La proteina TAT-RH così ottenuta è stata aggiunta direttamente al mezzo di coltura per gli esperimenti *in vitro* o iniettata nel tumore per gli esperimenti *in vivo*.

### **Preparazione di estratti nucleari**

Le cellule sono state lavate in un buffer fosfato freddo (PBS) e risospese in buffer ipotonico [10mM Hepes pH 7.9; 10mM KCl; 0.1 mM EDTA; 0.1 mM EGTA; 0.1 mM NaVO<sub>3</sub>; 1mM DTT; 0.5 mM PMSF]. Le cellule sono poi lisate con l'aggiunta di 10% NP40. I nuclei sono ottenuti mediante centrifugazione a 12000 rpm per 30'' e risospesi in buffer ipertonico [20mM Hepes pH 7.9; 400 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 20% Glycerol; 0.1 mM NaVO<sub>3</sub>; 1mM DTT; 0.5 mM PMSF]. L'istone 3 (H3) è stato utilizzato come controllo negli esperimenti di western blot.

### **Immunoprecipitazione e western blot**

Le cellule o i cuori prelevati dai ratti al termine del trattamento sono stati lisati in RIPA/SDS buffer [50mM Tris-HCl (pH 7,5), 150mM NaCl, 1%NP-40, 0,25% deoxycholate, 9,4mg/50ml sodium orthovanadate, 20% sodium dodecyl sulphate]. Le proteine sono state trasferite su membrana di nitrocellulosa mediante western blotting e visualizzate utilizzando lo specifico anticorpo mediante autoradiografia su lastra radiografica. L'immagine è stata digitalizzata e quindi processata per l'analisi densitometrica. L'immunoprecipitazione è realizzata su estratti totali precipitando le proteine con lo specifico anticorpo legato a beads di agarosio (A/G agarose beads, SantaCruz). Gli immunocomplessi sono stati poi analizzati mediante western blot.

### **Immunofluorescenza**

Le cellule sono cresciute su vetrini (chamber slides, Nunc, LabTek) e transfettate come indicato in figura. 24 ore dopo la trasfezione le cellule sono fissate in metanolo freddo e permeabilizzate con 0.01% Triton X-100 in PBS. Segue l'incubazione con lo specifico anticorpo primario e un anticorpo secondario fluoresceinato. Le immagini sono state realizzate su microscopio a fluorescenza Eclipse E1000 Fluorescence Microscope (Nikon).

### **Apoptosi**

L'analisi dell'apoptosi è stata realizzata mediante western blot utilizzando un anticorpo selettivo per la caspasi 3 clivata o mediante immunofluorescenza utilizzando un kit per la colorazione dell'Annexina V (Annexin-V-FLUOS Staining kit, Roche).

### **Saggio di Luciferasi**

Le cellule sono sottoposte a trasfezione transiente con un vettore plasmidico codificante il promotore del Fattore Natriuretico Atriale (ANF),  $\kappa$ B-luciferase reporter ( $\kappa$ B-Luc), e  $\beta$ -galattosidasi ( $\beta$ -Gal) mediante Lipofectamina (Invitrogen) seguendo il protocollo specifico. Al termine della trasfezione le cellule sono state lisate utilizzando uno specifico buffer di lisi in accordo con il protocollo del kit (Luciferase assay system with reporter lysis buffer, Promega) e i risultati sono stati analizzati al luminometro.

### **Elettrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA)**

Per valutare l'attività trascrizionale di NF $\kappa$ B, è stato effettuato un saggio EMSA su estratti nucleari da cellule o cuori di ratti (WKY e SHR). L'oligonucleotide doppio filamento di NF $\kappa$ B (5' AGTTGAGGGGACTTTCCCAGGC 3') è stato marcato con [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP (GE Healthcare). I campioni sono stati sottoposti ad elettroforesi su gel di poliacrilammide 8% in buffer TBE e autoradiografia.

### **Saggio di migrazione cellulare e saggio di angiogenesi *in vitro***

La migrazione cellulare e l'angiogenesi *in vitro* sono state valutate come precedentemente descritto <sup>45</sup>.

### **Analisi istologica**

Per l'analisi istologica, i cuori sono stati fissati in formalina e inclusi in paraffina. Le sezioni paraffinate, ottenute mediante taglio al microtomo, sono state sottoposte a colorazione Ematossilina-Eosina o tricromica di Masson, secondo il protocollo standard, per valutare rispettivamente la morfologia e la fibrosi. Su alcune sezioni sono state eseguite delle reazioni

di immunoistochimica utilizzando gli specifici anticorpi e colorando le proteine di interesse con diaminobenzidina (DAB).

### ***Studio *in vivo****

Tutte le procedure *in vivo* sono state approvate dal Comitato Etico locale dell'Università degli Studi di Napoli "Federico II".

### ***Studio sui tumori***

Per gli esperimenti sui tumori sono stati analizzati topi nudi del ceppo BALB/c (Charles River). Questo ceppo di topi è stato scelto per la sua immunodeficienza che permette a tumori iniettati di attecchire sottocute. Dopo una settimana di adattamento, una sospensione cellulare di circa 2,5 milioni di cellule di carcinoma umano anaplastico della tiroide (KAT4) è stata inoculata sottocute nel lato dorsale dei topi nudi. Dopo 10 giorni dall'iniezione delle cellule tumorali, sono visibili piccoli tumori del diametro di circa 0,5 cm. Il diametro del tumore è stato misurato con un calibro ed il volume calcolato applicando la formula  $V = A \times B^2/2$  (dove A= diametro maggiore, B= diametro minore). I topi sono stati suddivisi in gruppi: un gruppo di controllo e tre gruppi di trattati. I tre gruppi di trattati hanno ricevuto rispettivamente iniezioni di  $10^8$  pfu (low dose) e  $10^{11}$  pfu (high dose) dell'adenovirus AdGRK5-RH e 200 µg di proteina purificata TAT RH, mentre nei rispettivi controlli è stato iniettato un'uguale dose di adenovirus di controllo AdLac-Z o un uguale volume di soluzione fisiologica. Gli animali hanno ricevuto due trattamenti a settimana per circa tre settimane. Al termine del periodo di trattamento, gli animali sono stati sacrificati ed i tumori prelevati e conservati per l'analisi istologica e biochimica.

### ***Studio sull'ipertrofia ventricolare sinistra***



Per lo studio dell'ipertrofia ventricolare sinistra sono stati utilizzati ratti spontaneamente ipertesi ed ipertrofici (SHR) e ratti normotesi (WKY). I trattamenti sono stati effettuati mediante iniezione intra-cardiaca di AdLac-Z (come controllo) o AdGRK5-NT. Gli animali sono stati anestetizzati con isofluorano (4%), e intubati. Il torace è aperto mediante una mini-toracotomia parasternale destra per esporre il cuore. Sono poi effettuate 4 iniezioni da 50µl ognuna di AdGRK5-NT ( $10^{10}$ pfu/ml) o AdLac-Z ( $10^{10}$ pfu/ml), come controllo, nella parete cardiaca (anteriore, laterale, posteriore, apicale). Infine, il torace è velocemente richiuso utilizzando suture in seta 3-0. Nel gruppo dei ratti WKY, abbiamo impiantato sottocute una pompa osmotica (Alzet 2004) che rilascia PE (100 mg/kg) come già descritto in precedenza <sup>46</sup>.

### ***Ecocardiografia***

Gli ecocardiogrammi trans-toracici sono stati effettuati negli animali al momento del trattamento e 1 volta a settimana per 4 settimane. I ratti sono stati anestetizzati con isofluorano e posti sullo specifico apparato diagnostico. Gli ecocardiogrammi sono stati eseguiti utilizzando un'apparecchiatura elettronica dedicata (VeVo, VisualSonic) utilizzando una sonda specifica per ratti.

### ***Misurazione della pressione arteriosa***

La PA è stata misurata con metodologia invasiva mediante tecnologia Millar<sup>®</sup> (Millar Instruments, Houston, TX, USA). Un catetere 1.0-Fr (SPR 1000/2) è stato inserito nella carotide comune sinistra e fatto avanzare fino all'aorta ascendente in ratti anestetizzati con 98% ossigeno, 2% isofluorano, (IsoFlo, Veterinaria Esteve, Barcelona, Spain). La PA e la frequenza cardiaca sono state registrate per 15 minuti dopo la sospensione

dell'erogazione dell'anestetico, utilizzando un apposito registratore a 8 canali (Gould Instruments Systems, Cleveland, OH, USA). I dati sono stati analizzati con un software dedicato (Powerlab-Chart 5, ADInstruments, Sydney, NSW, Australia).

#### **Analisi statistica.**

L'analisi della varianza è stata effettuata utilizzando il software SPSS. In base a studi pilota abbiamo osservato che la differenza minima tra gruppi è di circa un ordine di grandezza. Le dimensioni dei campioni sono state ricavate dalla Power Analysis, per ottenere una differenza statistica di 0,05.

## RISULTATI

### Studio *in vitro*: cellule endoteliali

#### *L'overespressione di GRK5 determina accumulo nucleare di IκBα*

Abbiamo valutato la localizzazione cellulare di GRK5 e IκBα, in cellule endoteliali di aorta bovina (BAEC) con overespressione della forma wild type (WT) di GRK5 mediante western blot. L'overespressione di GRK5-WT aumenta i livelli totali di IκBα, inducendo l'accumulo di IκBα nel nucleo (Fig. 1A). La Figura 1B mostra che i livelli totali e nucleari di GRK5 dopo la trasfezione aumentano in maniera dose dipendente e si associano con un progressivo accumulo di IκBα sia in estratti totali che nucleari. In accordo agli aumenti di IκBα, l'attività trascrizionale di NFκB, valutata mediante saggio di luciferasi, diminuisce nel tempo. All'opposto, il silenziamento di GRK5, ottenuto mediante l'utilizzo di siRNA in HEK293, diminuisce i livelli di IκBα e causa l'aumento dell'attività di NFκB (Fig. 1C). Questi dati suggeriscono che GRK5 è in grado di regolare l'attività trascrizionale di NFκB mediante stabilizzazione di IκBα nel nucleo. Per verificare se l'attività catalitica di GRK5 sia necessaria a determinare l'accumulo di IκBα, abbiamo overespresso nelle cellule una forma mutata di GRK5 che è priva di attività catalitica (K215R).

GRK5-WT e GRK5-K215R sono entrambe presenti nel nucleo (Fig. 1D) dove agiscono allo stesso modo nel determinare un aumento di IκBα e una riduzione dell'attività di NFκB. Quindi, l'attività catalitica di GRK5 non è indispensabile per determinare l'inibizione dell'attività trascrizionale di NFκB.

### ***GRK5 interagisce con IκBα***

Abbiamo, quindi, valutato in BAEC la possibilità che GRK5 possa interagire direttamente con IκBα. Mediante esperimenti di co-immunoprecipitazione abbiamo dimostrato che GRK5 interagisce con IκBα (Fig.2A). Dal momento che IκBα è notoriamente legato a NFκB, per determinare se il legame tra GRK5 e IκBα fosse mediato da NFκB, abbiamo ripetuto l'esperimento di co-immunoprecipitazione utilizzando le proteine purificate di GRK5, IκBα e MEK-I (come controllo negativo). GRK5 è in grado di immunoprecipitare IκBα, indicando che l'interazione tra GRK5 e IκBα è diretta e non mediata da altre proteine (Fig.2B).

### ***RH è il dominio di GRK5 responsabile dell'interazione con IκBα***

Per identificare la regione di GRK5 che interagisce con IκBα, abbiamo generato dei mini-geni di GRK5, taggati con myc e istidina (Fig. 3A): GRK5-WT (1-590 aa), GRK5-NT (1-176 aa), GRK5-RH (50-176 aa) e GRK5-CT (176-590 aa). GRK5-WT, -NT e -RH, ma non -CT, sono tutti in grado di precipitare IκBα (Fig. 3B). Questi dati suggeriscono che il dominio RH è il dominio di GRK5 che lega IκBα. Infatti, l'overespressione di GRK5-RH in BAEC aumenta i livelli totali (Fig. 3C) e nucleari di IκBα (Fig. 3D) e inibisce l'attività trascrizionale di NFκB (Fig. 3E). Per poter identificare il dominio di IκBα che interagisce con GRK5, abbiamo clonato la forma mutata di IκBα che è priva del dominio amino-terminale, e abbiamo valutato la sua capacità di co-immunoprecipitare con GRK5. La Fig. 3F mostra che IκBα-WT co-immunoprecipita con GRK5 mentre IκBα-CT non lega GRK5. Entrambi i mutanti di IκBα legano NFκB. Questi dati

dimostrano che GRK5-RH interagisce con il complesso NFκB/IκBα mediante legame diretto con il dominio amino-terminale di IκBα.

#### ***GRK5-RH inibisce la trascrizione di TNFα***

Abbiamo, quindi, studiato gli effetti biologici di questo nuovo meccanismo di regolazione dell'attività di NFκB. NFκB regola l'espressione di molte citochine, tra cui TNFα. Dal momento che abbiamo dimostrato che GRK5 inibisce l'attivazione di NFκB, abbiamo valutato l'abilità di GRK5-RH di regolare l'espressione di citochine, in particolare TNFα, mediante Real Time PCR. GRK5-RH inibisce l'espressione genica di TNFα indotta dalla stimolazione con LPS (Fig. 4A).

#### ***GRK5-RH aumenta l'apoptosi***

NFκB regola le risposte apoptotiche sia in contesti fisiologici che patologici. L'overespressione di GRK5-RH aumenta i livelli di caspasi 3 clivata, marker di apoptosi (Fig. 4B). Questo dato è stato confermato mediante analisi dell'apoptosi in fluorescenza utilizzando Annessina V come target (Fig. 4C). Questi dati suggeriscono che l'inibizione di NFκB indotta da GRK5-RH causa aumento delle risposte apoptotiche.

#### ***GRK5-RH inibisce la migrazione e la neo-angiogenesi delle cellule endoteliali***

Abbiamo valutato anche altri fenotipi pro-angiogenici che sono regolati da NFκB. In particolare, abbiamo studiato gli effetti di GRK5-RH sulla migrazione cellulare, utilizzando un cell monolayer-wounding assay, e sulla angiogenesi in vitro. L'overespressione di GRK5-RH nelle BAEC inibisce la migrazione cellulare (Fig. 4D ) e la formazione di nuovi vasi su matrice

extracellulare di matrigel (Fig. 4E), suggerendo che GRK5-RH regola negativamente le risposte pro-angiogeniche delle cellule endoteliali.

Quindi, questa prima parte dello studio rivela una nuova funzione cellulare di GRK5, di regolazione della trascrizione genica. In particolare, GRK5 inibisce l'attività trascrizionale di NF $\kappa$ B mediante legame diretto del suo dominio RH con la proteina inibitoria I $\kappa$ B $\alpha$  e stabilizzazione del complesso NF $\kappa$ B/I $\kappa$ B $\alpha$  nel nucleo. Questi risultati propongono quindi GRK5-RH come possibile target terapeutico per tutte quelle condizioni patologiche caratterizzate da un aumento dell'attività trascrizionale di NF $\kappa$ B.

Alla luce di tale risultato abbiamo voluto valutare l'effetto del trattamento con GRK5- NT in patologie caratterizzate da elevata attivazione di NF $\kappa$ B, come il cancro e l'ipertrofia ventricolare sinistra.

## **Valutazione degli effetti di GRK5-NT *in vivo*: Studio sui tumori**

### ***GRK5-NT regola il signaling di NFκB in cellule tumorali in vitro e in vivo: trattamento con l'adenovirus***

Per valutare gli effetti biologici dell'inibizione dell'attività di NFκB indotta da GRK5, abbiamo condotto i nostri studi in modello patologico *in vitro*, il cancro, in cui l'attività di NFκB è costitutivamente attiva. In cellule tumorali KAT4, l'overespressione di GRK5-NT mediata da adenovirus (AdGRK5-NT) induce localizzazione nucleare di IκBα (Fig. 5A) e, anche in questo tipo cellulare, l'interazione tra GRK5-NT e IκBα è presente in condizioni basali ed aumenta dopo overespressione di GRK5-NT (dati non mostrati). L'effetto più rilevante dell'aumentata attività di NFκB nel tumore è il blocco dei processi apoptotici. Abbiamo quindi valutato l'apoptosi nelle cellule KAT4 in cui abbiamo overespresso GRK5-NT. L'overespressione di GRK5-NT causa un aumento dei livelli di caspasi 3 clivata (Fig. 5B) e di Annessina V sulla membrana cellulare (Fig.5C), che si associa ad una inibizione dell'attività di NFκB (Fig. 5D). Per validare i dati ottenuti *in vitro*, abbiamo studiato gli effetti di GRK5-NT in un modello di cancro *in vivo*. In topi nudi (BALB/c) di circa 6 settimane è stata inoculata sottocute una sospensione cellulare di circa 2,5 milioni di cellule di carcinoma anaplastico della tiroide (KAT4). Dopo 10 giorni dall'iniezione, abbiamo iniziato il trattamento del tumore con basse ed alte dosi dell'adenovirus codificante GRK-NT. Il grafico in Fig. 6A mostra che il trattamento con basse dosi di AdGRK5-NT è in grado di rallentare la crescita del tumore rispetto al controllo e, aumentando la quantità di virus, il trattamento risulta più efficace, dal momento che inibisce completamente la proliferazione

delle cellule tumorali mantenendo inalterato il volume del tumore dall'inizio del trattamento. L'inibizione della crescita tumorale nei trattati ad alte dosi di AdGRK5-NT è in accordo con la media del peso dei tumori trattati rispetto a quelli di controllo (Fig. 6A). Non si sono verificati cambiamenti significativi nel peso corporeo degli animali nei tre gruppi nel corso del trattamento, il che indica una bassa tossicità del trattamento. Al termine del trattamento i tumori sono stati prelevati ed omogenati nel buffer RIPA/SDS per l'analisi biochimica. L'espressione di GRK5-NT nelle cellule tumorali è evidenziata mediante analisi in fluorescenza, in sezioni di tessuto incluso in paraffina (Fig. 6B). L'espressione dell'adenovirus di controllo è valutata mediante colorazione con X-GAL (Fig. 6B). Nei campioni omogenati sono stati valutati i livelli totali di I $\kappa$ B $\alpha$ . In accordo con i risultati *in vitro*, il trattamento con AdGRK5-NT causa un accumulo di I $\kappa$ B $\alpha$  (Fig. 6C). L'angiogenesi patologica è essenziale per la progressione maligna dei tumori solidi e il fattore fondamentale che regola questo processo è il Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). Abbiamo quindi valutato i livelli di espressione del VEGF nei campioni di tumore. Si osserva una diminuzione dei livelli di espressione del VEGF nei trattati rispetto ai controlli che è in accordo con la riduzione della crescita tumorale (Fig. 6C). L'apoptosi è l'effetto principale dell'inibizione dell'attività di NF $\kappa$ B, dal momento che nello sviluppo tumorale la cellula maligna evade i meccanismi che inducono morte cellulare mediante l'attivazione di meccanismi anti-apoptotici NF $\kappa$ B-dipendenti. Nei tumori trattati si osserva un aumento di caspase 3 clivata (Fig. 6C). Questi dati suggeriscono un'inibizione



dell'attività di NF $\kappa$ B nei tumori trattati con AdGRK5-NT, che è stata confermata mediante EMSA (Fig. 6D).

***GRK5-NT regola il signaling di NF $\kappa$ B in cellule tumorali in vitro e in vivo: trattamento con TAT-RH***

Al fine di ridurre i livelli di tossicità che possono essere prodotti dal trattamento con l'adenovirus, abbiamo clonato il minigene che corrisponde alla regione RH di GRK5 (Fig.7A) e purificato la proteina RH (Fig.7B), che essendo fusa alla proteina TAT è in grado di entrare all'interno della cellula senza essere veicolata da alcun tipo di vettore (Fig. 7C). Abbiamo testato l'efficacia di azione della proteina TAT-RH, analizzando *in vitro*, in cellule KAT4, i livelli totali di I $\kappa$ B $\alpha$  e gli effetti pro-apoptotici, mediante western blot. L'aggiunta della proteina ricombinante al mezzo di coltura determina aumento dei livelli di I $\kappa$ B $\alpha$  e caspasi 3 clivata (Fig. 7D). L'effetto di TAT-RH sull'apoptosi è stato confermato mediante colorazione di Annessina V in fluorescenza (Fig. 7E), in cui l'apoptosi viene determinata misurando il legame dell'Annessina V ai residui di fosfatidilserina, la quale durante il processo apoptotico si sposta dal foglietto interno a quello esterno della membrana plasmatica. Abbiamo, quindi, testato gli effetti della proteina *in vivo*. Gli animali sono stati sottoposti ad iniezione intra-tumore di 200  $\mu$ g di proteina purificata (2 iniezioni/settimana per 4 settimane). Il trattamento è in grado di riprodurre gli stessi effetti indotti dal trattamento con alte dosi di AdGRK5-NT (Fig. 8A). Anche durante il trattamento con la proteina purificata, così come nel trattamento con l'adenovirus, non sono state osservate variazioni significative nel peso corporeo tra animali di controllo e trattati. I tumori prelevati al termine del trattamento sono stati utilizzati per

l'analisi biochimica. Anche TAT-RH, come AdGRK5-NT, è in grado di aumentare i livelli di I $\kappa$ B $\alpha$  e caspasi 3 clivata, e ridurre l'espressione di VEGF (Fig. 8B). Tutto questo si associa ad una riduzione dell'attività trascrizionale di NF $\kappa$ B (Fig. 8C), valutata mediante EMSA.

Al fine di valutare gli eventuali effetti tossici indotti dal trattamento con la proteina TAT-RH, alcuni animali sono stati sottoposti ad iniezione intraperitoneale di 200  $\mu$ g di proteina TAT RH. Sono state utilizzate le stesse quantità di proteina, uguale numero di iniezioni e durata di trattamento che sono risultati efficaci nella inibizione della crescita tumorale. I parametri che sono stati presi in considerazione per valutare gli effetti avversi della proteina purificata sono stati:

- sintomi tossici, consumo di cibo e acqua, e modifiche del peso corporeo mediante osservazione giornaliera
- peso ed analisi istologica degli organi interni (polmone, rene, fegato) al termine dello studio

Dall'analisi di questi parametri risulta che per l'intera durata del trattamento non si è verificato alcun cambiamento dello stato di salute generale dei topi trattati con iniezione intra-peritoneale della proteina; in particolare, non sono state osservate differenze significative del peso corporeo degli animali trattati rispetto a quelli di controllo (dati non mostrati) né segni di inappetenza o disidratazione, alterazioni del trofismo e della pigmentazione della cute. Inoltre, al termine del trattamento con iniezione intra-peritoneale della proteina, gli animali sono stati sacrificati e gli organi interni prelevati. Non è stata osservata alcuna modificazione del peso o della morfologia di

polmone, rene e fegato, il che evidenzia l'assenza di danni organo-specifici, negli animali in trattamento rispetto agli animali di controllo.

## **Valutazione degli effetti di GRK5-NT *in vivo*: Studio sull'ipertrofia cardiaca**

### ***Studio in vitro***

Abbiamo valutato *in vitro* l'effetto di GRK5-NT, che comprende il dominio RH, sulla regolazione del signaling e dell'attività trascrizionale di NF $\kappa$ B in cardiomioblasti in coltura (H9C2). In queste cellule, AdGRK5-NT determina un aumento dei livelli totali di I $\kappa$ B $\alpha$  (Fig. 9A), valutati mediante western blot. L'effetto di GRK5-NT sull'attività di NF $\kappa$ B è stato valutato mediante saggio di luciferasi. PE aumenta l'attività trascrizionale di NF $\kappa$ B e l'overespressione di GRK5-NT riduce questo effetto sia in condizioni basali che dopo stimolazione con PE (Fig. 9B), suggerendo che NF $\kappa$ B è regolato da stimoli ipertrofici nelle cellule cardiache e che GRK5-NT è in grado di modulare questo fenomeno.

Per valutare la capacità di GRK5-NT di regolare l'ipertrofia *in vitro*, abbiamo effettuato un saggio di luciferasi per il promotore dell'ANF. La Fig. 9C mostra che l'overespressione di GRK5-NT inibisce l'attività del promotore dell'ANF indotta da PE. Questi dati *in vitro* suggeriscono che GRK5-NT può regolare l'espressione di geni ipertrofici mediante la modulazione dell'attività di NF $\kappa$ B.

### ***Studio in vivo in ratti SHR***

#### ***Parametri ecocardiografici***

Per gli esperimenti *in vivo* abbiamo utilizzato come modello animale i ratti SHR, nei quali l'ipertrofia ventricolare sinistra (LVH) è indotta dall'ipertensione. AdGRK5-NT o AdLac-Z sono stati iniettati nella parete

cardiaca di questi animali e LVH è stata valutata dopo 4 settimane dall'iniezione, mediante ecocardiografia. Il trattamento con AdGRK5-NT riduce lo spessore del setto interventricolare (IVS) e della parete posteriore (PW) (Figure 10A), LVM/BW (Figure 10B) e il rapporto HW/BW (Figure 10C). LVEF e LVFS, che sono diminuite nei ratti SHR di controllo rispetto ai WKY, ritornano ai livelli dei ratti normotesi negli animali trattati con AdGRK5-NT (Figure 10D). L'analisi biochimica conferma la riduzione di LVH. Abbiamo infatti valutato l'espressione di un gene marcatore di ipertrofia, ANF, e di infiammazione,  $TNF\alpha$  mediante Real Time PCR. Dopo 1 settimana dall'inizio del trattamento l'espressione dell'ANF è significativamente ridotta nel cuore di ratti trattati con AdGRK5-NT e dopo 4 settimane si osserva un'ulteriore riduzione (Figure 2E). Un simile risultato è ottenuto per il  $TNF\alpha$  (figure 2E). Per escludere la possibilità che l'ipertensione sia coinvolta in questo fenomeno, abbiamo misurato i livelli di pressione arteriosa (PA) in questi animali al termine dello studio. La PA è sorprendentemente aumentata nei ratti trattati con AdGRK5-NT rispetto ai controlli. (Figure 2F). questo può essere dovuto ad un miglioramento della funzione cardiaca come mostrato dai risultati dei  $dP/dt$  max e min che sono entrambi migliorati negli animali trattati con AdGRK5-NT (WKY:  $+7989 \pm 486$ ,  $-6728 \pm 452$ ; SHR  $+4087 \pm 315$ ,  $-4555 \pm 419$ ; AdLac -Z:  $+4296 \pm 521$ ,  $-4962 \pm 503$ ; AdGRK5-NT:  $+7543 \pm 683$ ,  $-6975 \pm 547$  mmHg/s;  $p < 0.05$ ).

### ***Analisi istologica***

A 1 e 4 settimane dall'iniezione, i cuori sono stati prelevati e l'espressione di AdGRK5-NT è stata valutata mediante analisi istologica. GRK5-NT è

espresso omogeneamente nel cuore ad 1 settimana di trattamento e, sebbene ridotto, è ancora presente a 4 settimane come mostrato dai risultati dell'immunoistochimica e dell'immunofluorescenza (Figure 11A). LVH causata da ipertensione cronica si associa a due processi patologici: ipertrofia dei cardiomiociti e fibrosi. Quindi, per confermare l'effetto inibitorio di GRK5-NT sull'ipertrofia cardiaca, abbiamo analizzato le dimensioni dei cardiomiociti e la fibrosi mediante analisi istologica. Entrambe sono ridotte dal trattamento con AdGRK5-NT (Figure 11B).

### ***Signaling di NFκB***

A conferma dei dati *in vivo*, abbiamo analizzato *ex vivo* l'effetto del trattamento con GRK5-NT sul signaling di NFκB nei cuori dei ratti SHR. In estratti cellulari totali, i livelli di IκBα sono aumentati dal trattamento con AdGRK5-NT rispetto ai controlli trattati con AdLacZ (Figure 11C). A questo si associa una localizzazione nucleare sia di IκBα che NFκB, con una riduzione della forma fosforilata e quindi attiva di NFκB (Figure 11D). Abbiamo quindi valutato l'attività trascrizionale di NFκB mediante EMSA, che risulta diminuita in maniera tempo-dipendente negli animali trattati con AdGRK5-NT (Figure 11E). Abbiamo inoltre confermato l'inibizione di NFκB indotta da GRK5-NT nei cuori ipertrofici, valutando l'effetto del trattamento sull'apoptosi, evento che è sotto il controllo trascrizionale di NFκB. I livelli di caspasi 3 clivata, marcatore di apoptosi, risultano aumentati nei ratti SHR trattati con AdGRK5-NT rispetto ai controlli (Fig. 11C).

### **Studio *in vivo* in ratti WKY**

Abbiamo verificato se AdGRK5-NT fosse in grado di prevenire lo sviluppo dell'ipertrofia cardiaca in ratti WKY nei quali l'ipertrofia è indotta farmacologicamente mediante stimolazione cronica con PE (14 giorni). I ratti sono trattati con AdGRK5-NT o AdLac-Z prima di indurre l'ipertrofia per valutarne l'evoluzione. Il rimodellamento cardiaco è stato valutato mediante analisi ecocardiografica una volta a settimana per due settimane. AdGRK5-NT previene in maniera significativa lo sviluppo di LVH indotta da PE, come dimostrato dalla riduzione di IVS (Figure 12A), LVM/BW (Figure 12B) e HW/BW (Figure 12C). Questo si associa anche ad una riduzione dell'espressione genica dell'ANF, valutata mediante Real Time PCR (Figure 12D).

## DISCUSSIONE

La famiglia delle GRK è conosciuta per la sua capacità di regolare l'attività di recettori di membrana associati a proteina G (GPCR), mediante eventi di fosforilazione e desensibilizzazione del recettore. Negli ultimi anni diversi studi hanno riportato nuovi target cellulari per queste chinasi. Le GRK, infatti, sono in grado di interagire con proteine non recettoriali (PI3K, AKT, MEK), suggerendo quindi nuove funzioni cellulari per queste chinasi <sup>47-49</sup>. Inoltre, è stato dimostrato che GRK5 è in grado di localizzarsi all'interno del nucleo <sup>12</sup>, ma finora non è stata ancora chiarita la sua funzione nucleare. Il nostro lavoro contribuisce a chiarire questo aspetto, infatti in questo studio abbiamo confermato la presenza di GRK5 nel nucleo ed identificato la funzione nucleare di questa chinasi. In particolare, i nostri dati mostrano che GRK5 regola negativamente l'attività trascrizionale di NFκB, attraverso l'interazione con la proteina inibitoria, IκBα. Mediante il clonaggio di singoli domini di GRK5 e IκBα abbiamo identificato le regioni coinvolte in questa interazione: il dominio RH di GRK5 (GRK5-RH) e il dominio amino-terminale di IκBα (IκBα-NT). Il meccanismo di regolazione si basa su un'interazione proteina-proteina in cui RH maschera la sequenza NES su IκBα causando la stabilizzazione del complesso NFκB/IκBα nel nucleo e, di conseguenza, inibizione della trascrizione genica. Questo meccanismo di regolazione sembra essere ubiquitario dal momento che questa interazione è presente in diversi tipi cellulari: BAEC, HEK293, KAT4, H9C2.

La nostra scoperta di un nuovo meccanismo di regolazione dell'attività di NFκB, basato sull'interazione proteina-proteina, potrebbe avere una certa rilevanza fisio-patologica dal momento che NFκB regola l'espressione di



geni coinvolti nelle risposte infiammatorie <sup>24, 50, 51</sup> e in diverse patologie, come cancro <sup>50-53</sup>, disfunzione cardiovascolare <sup>51, 52</sup>, infiammazione cronica <sup>11</sup>. Abbiamo quindi testato l'effetto del dominio RH di GRK5 in due diverse patologie caratterizzate da un'elevata attivazione di NFκB, il cancro e l'ipertrofia ventricolare sinistra.

Avendo dimostrato che RH è un inibitore dell'attività trascrizionale di NFκB, abbiamo valutato gli effetti di RH *in vivo* in un modello murino di cancro. Il trattamento con RH, ottenuto mediante terapia genica mediata da adenovirus, è in grado di bloccare la crescita tumorale in maniera dose-dipendente, attraverso l'induzione della morte cellulare per apoptosi. La terapia genica mediata da adenovirus presenta, però, diversi problemi nell'applicazione terapeutica per la tossicità e l'immunogenicità indotti dal virus stesso. Per questo motivo, abbiamo clonato il gene RH in un vettore che comprende la sequenza TAT, per la generazione di una proteina ricombinante che è in grado tramite TAT di oltrepassare la membrana plasmatica ed entrare all'interno della cellula senza necessità di essere veicolata. TAT è una piccola sequenza di 11 aminoacidi che deriva dalla proteina HIV TAT <sup>54</sup>, che si lega alla superficie cellulare ed entra nel citoplasma della cellula target. Questo sistema è già stato usato con successo per il trasferimento di proteine ricombinanti nel trattamento di modelli murini di cancro, infiammazione ed altre patologie <sup>55, 56</sup>.

I nostri dati indicano che la proteina TAT RH penetra nelle cellule tumorali inducendo apoptosi. In questo modo RH blocca la proliferazione cellulare e di conseguenza la crescita del tumore. Uno degli aspetti più problematici nella terapia del cancro basata sull'inibizione dell'attività di NFκB è la

difficoltà di trovare molecole che bloccano l'attività oncogenica di NFκB senza interferire con la sua attività fisiologica nell'infiammazione e omeostasi cellulare. Purtroppo, molti dei target terapeutici analizzati fino ad oggi, pur essendo efficaci nell'inibizione del signaling di NFκB, sono comunque tossici per l'organismo. La proteina TAT RH, invece, non risultata essere tossica dal momento che l'iniezione intraperitoneale della proteina ricombinante non ha indotto variazioni dello stato di salute generale degli animali in trattamento né specifici danni d'organo.

Un'ulteriore conferma dell'effetto inibitorio di GRK5-RH sull'attività di NFκB e i fenotipi ad esso associati deriva dallo studio di un altro modello patologico, l'ipertrofia cardiaca. Abbiamo utilizzato un modello genetico di ipertrofia, il ratto SHR, in cui l'ipertrofia è indotta dagli elevati livelli di pressione arteriosa. È stato descritto che l'inibizione di NFκB riduce l'ipertrofia cardiaca in SHR in maniera indipendente dalla pressione <sup>57</sup>. Infatti, l'idralazina, che riduce PA senza modificare la massa cardiaca, non ha effetto sulla massa cardiaca o sull'attività di NFκB in SHR <sup>57</sup>. Al contrario, l'inibizione farmacologica di NFκB con PDTC o il trattamento con un ACE-inibitore (captopril) riduce significativamente le dimensioni del cuore e inibisce l'attività di NFκB <sup>57</sup>. I nostri dati sono quindi in accordo con la letteratura; infatti GRK5-NT è in grado di inibire l'attività di NFκB in cardiomiociti e di conseguenza ridurre l'ipertrofia cardiaca senza cambiare la PA. L'effetto di GRK5-NT sull'ipertrofia cardiaca in SHR non si associa con una riduzione ma piuttosto con un aumento della PA, probabilmente dovuto ad un miglioramento della contrattilità cardiaca, come mostrato dai risultati dei  $dP/dt$  e della frazione di eiezione. Abbiamo anche effettuato

esperimenti *in vivo* in un altro modello di ipertrofia (ratti normotesi WKY in cui l'ipertrofia è indotta da stimolazione cronica con PE) che hanno confermato questi risultati. Quindi questi dati mostrano che GRK5-NT regola l'ipertrofia cardiaca indipendentemente dal modello animale e che l'attivazione di NFκB è un fattore determinante della risposta ipertrofica. Per lo studio *in vivo* abbiamo utilizzato una nuova tecnica, l'iniezione intracardiaca di un adenovirus, che permette una espressione omogenea e selettiva nel cuore di GRK5-NT.

In conclusione, in questo studio abbiamo identificato una nuova funzione di GRK5 di regolazione della trascrizione genica mediante l'inibizione dell'attività trascrizionale del fattore di trascrizione NFκB. In particolare, abbiamo identificato il dominio responsabile di questo effetto (RH) per il quale abbiamo generato una proteina sintetica in grado di riprodurre gli stessi effetti ma senza necessità di essere veicolata nelle cellule. Abbiamo inoltre testato questo meccanismo *in vivo* in due diversi modelli di patologia in cui NFκB è costitutivamente attivo e abbiamo dimostrato che il dominio RH di GRK5 è in grado di inibire la crescita tumorale e l'ipertrofia ventricolare sinistra mediante inibizione dell'attività trascrizionale di NFκB. Questi risultati sono promettenti per una possibile applicazione terapeutica della proteina RH in quelle patologie in cui sono presenti elevati livelli di NFκB o caratterizzate da un'elevata infiammazione.

## BIBLIOGRAFIA

1. Premont RT, Inglese J, Lefkowitz RJ. Protein kinases that phosphorylate activated G protein-coupled receptors. *FASEB J*. 1995;9(2):175-182.
2. Lefkowitz RJ, Whalen EJ. beta-arrestins: traffic cops of cell signaling. *Curr Opin Cell Biol*. 2004;16(2):162-168.
3. Lefkowitz RJ, Shenoy SK. Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science*. 2005;308(5721):512-517.
4. Pierce KL, Lefkowitz RJ. Classical and new roles of beta-arrestins in the regulation of G-protein-coupled receptors. *Nat Rev Neurosci*. 2001;2(10):727-733.
5. Hall RA, Premont RT, Lefkowitz RJ. Heptahelical receptor signaling: beyond the G protein paradigm. *J Cell Biol*. 1999;145(5):927-932.
6. Virlon B, Firsov D, Cheval L, Reiter E, Troispoux C, Guillou F, Elalouf JM. Rat G protein-coupled receptor kinase GRK4: identification, functional expression, and differential tissue distribution of two splice variants. *Endocrinology*. 1998;139(6):2784-2795.
7. Penn RB, Pronin AN, Benovic JL. Regulation of G protein-coupled receptor kinases. *Trends Cardiovasc Med*. 2000;10(2):81-89.
8. Carman CV, Parent JL, Day PW, Pronin AN, Sternweis PM, Wedegaertner PB, Gilman AG, Benovic JL, Kozasa T. Selective regulation of G $\alpha$ (q/11) by an RGS domain in the G protein-coupled receptor kinase, GRK2. *J Biol Chem*. 1999;274(48):34483-34492.
9. Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*. 2006;124(4):783-801.
10. Baldwin AS, Jr. Series introduction: the transcription factor NF-kappaB and human disease. *J Clin Invest*. 2001;107(1):3-6.
11. Li Q, Verma IM. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(10):725-734.
12. Johnson LR, Scott MG, Pitcher JA. G protein-coupled receptor kinase 5 contains a DNA-binding nuclear localization sequence. *Mol Cell Biol*. 2004;24(23):10169-10179.
13. Gilmore TD. Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene*. 2006;25(51):6680-6684.
14. Dolcet X, Llobet D, Encinas M, Pallares J, Cabero A, Schoenenberger JA, Comella JX, Matias-Guiu X. Proteasome inhibitors induce death but activate NF-kappaB on endometrial carcinoma cell lines and primary culture explants. *J Biol Chem*. 2006;281(31):22118-22130.
15. Karin M, Cao Y, Greten FR, Li ZW. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(4):301-310.
16. Kopp E, Ghosh S. Inhibition of NF-kappa B by sodium salicylate and aspirin. *Science*. 1994;265(5174):956-959.
17. Traenckner EB, Pahl HL, Henkel T, Schmidt KN, Wilk S, Baeuerle PA. Phosphorylation of human I kappa B-alpha on serines 32 and 36 controls I kappa B-alpha proteolysis and NF-kappa B activation in response to diverse stimuli. *EMBO J*. 1995;14(12):2876-2883.

18. Traenckner EB, Wilk S, Baeuerle PA. A proteasome inhibitor prevents activation of NF-kappa B and stabilizes a newly phosphorylated form of I kappa B-alpha that is still bound to NF-kappa B. *EMBO J.* 1994;13(22):5433-5441.
19. Ghosh S, May MJ, Kopp EB. NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 1998;16:225-260.
20. Johnson C, Van Antwerp D, Hope TJ. An N-terminal nuclear export signal is required for the nucleocytoplasmic shuttling of IkappaBalpha. *EMBO J.* 1999;18(23):6682-6693.
21. Witherow DS, Garrison TR, Miller WE, Lefkowitz RJ. beta-Arrestin inhibits NF-kappaB activity by means of its interaction with the NF-kappaB inhibitor IkappaBalpha. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(23):8603-8607.
22. Parameswaran N, Pao CS, Leonhard KS, Kang DS, Kratz M, Ley SC, Benovic JL. Arrestin-2 and G protein-coupled receptor kinase 5 interact with NFkappaB1 p105 and negatively regulate lipopolysaccharide-stimulated ERK1/2 activation in macrophages. *J Biol Chem.* 2006;281(45):34159-34170.
23. Baldwin AS, Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol.* 1996;14:649-683.
24. Beinke S, Ley SC. Functions of NF-kappaB1 and NF-kappaB2 in immune cell biology. *Biochem J.* 2004;382(Pt 2):393-409.
25. Silverman N, Maniatis T. NF-kappaB signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes Dev.* 2001;15(18):2321-2342.
26. Yamamoto Y, Gaynor RB. Therapeutic potential of inhibition of the NF-kappaB pathway in the treatment of inflammation and cancer. *The Journal of clinical investigation.* 2001;107(2):135-142.
27. Pacifico F, Mauro C, Barone C, Crescenzi E, Mellone S, Monaco M, Chiappetta G, Terrazzano G, Liguoro D, Vito P, Consiglio E, Formisano S, Leonardi A. Oncogenic and anti-apoptotic activity of NF-kappa B in human thyroid carcinomas. *The Journal of biological chemistry.* 2004;279(52):54610-54619.
28. Ross JS, Stagliano NE, Donovan MJ, Breitbart RE, Ginsburg GS. Atherosclerosis: a cancer of the blood vessels? *American journal of clinical pathology.* 2001;116 Suppl:S97-107.
29. Kane RC, Bross PF, Farrell AT, Pazdur R. Velcade: U.S. FDA approval for the treatment of multiple myeloma progressing on prior therapy. *The oncologist.* 2003;8(6):508-513.
30. Kojima M, Morisaki T, Sasaki N, Nakano K, Mibu R, Tanaka M, Katano M. Increased nuclear factor-kB activation in human colorectal carcinoma and its correlation with tumor progression. *Anticancer research.* 2004;24(2B):675-681.
31. Jimi E, Aoki K, Saito H, D'Acquisto F, May MJ, Nakamura I, Sudo T, Kojima T, Okamoto F, Fukushima H, Okabe K, Ohya K, Ghosh S. Selective inhibition of NF-kappa B blocks osteoclastogenesis and prevents inflammatory bone destruction in vivo. *Nature medicine.* 2004;10(6):617-624.
32. Dewan MZ, Terashima K, Taruishi M, Hasegawa H, Ito M, Tanaka Y, Mori N, Sata T, Koyanagi Y, Maeda M, Kubuki Y, Okayama A, Fujii M,

- Yamamoto N. Rapid tumor formation of human T-cell leukemia virus type 1-infected cell lines in novel NOD-SCID/gammac(null) mice: suppression by an inhibitor against NF-kappaB. *Journal of virology*. 2003;77(9):5286-5294.
33. Van Antwerp DJ, Martin SJ, Kafri T, Green DR, Verma IM. Suppression of TNF-alpha-induced apoptosis by NF-kappaB. *Science (New York, N.Y.)*. 1996;274(5288):787-789.
  34. Keys JR, Greene EA, Cooper CJ, Naga Prasad SV, Rockman HA, Koch WJ. Cardiac hypertrophy and altered beta-adrenergic signaling in transgenic mice that express the amino terminus of beta-ARK1. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;285(5):H2201-2211.
  35. Yi XP, Gerdes AM, Li F. Myocyte redistribution of GRK2 and GRK5 in hypertensive, heart-failure-prone rats. *Hypertension*. 2002;39(6):1058-1063.
  36. Kawamura N, Kubota T, Kawano S, Monden Y, Feldman AM, Tsutsui H, Takeshita A, Sunagawa K. Blockade of NF-kappaB improves cardiac function and survival without affecting inflammation in TNF-alpha-induced cardiomyopathy. *Cardiovasc Res*. 2005;66(3):520-529.
  37. Aikawa R, Nagai T, Tanaka M, Zou Y, Ishihara T, Takano H, Hasegawa H, Akazawa H, Mizukami M, Nagai R, Komuro I. Reactive oxygen species in mechanical stress-induced cardiac hypertrophy. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;289(4):901-907.
  38. Harada K, Komuro I, Shiojima I, Hayashi D, Kudoh S, Mizuno T, Kijima K, Matsubara H, Sugaya T, Murakami K, Yazaki Y. Pressure overload induces cardiac hypertrophy in angiotensin II type 1A receptor knockout mice. *Circulation*. 1998;97(19):1952-1959.
  39. Bessho R, Matsubara K, Kubota M, Kuwakado K, Hirota H, Wakazono Y, Lin YW, Okuda A, Kawai M, Nishikomori R, et al. Pyrrolidine dithiocarbamate, a potent inhibitor of nuclear factor kappa B (NF-kappa B) activation, prevents apoptosis in human promyelocytic leukemia HL-60 cells and thymocytes. *Biochem Pharmacol*. 1994;48(10):1883-1889.
  40. Meiners S, Laule M, Rother W, Guenther C, Prauka I, Muschick P, Baumann G, Kloetzel PM, Stangl K. Ubiquitin-proteasome pathway as a new target for the prevention of restenosis. *Circulation*. 2002;105(4):483-489.
  41. Brown M, McGuinness M, Wright T, Ren X, Wang Y, Boivin GP, Hahn H, Feldman AM, Jones WK. Cardiac-specific blockade of NF-kappaB in cardiac pathophysiology: differences between acute and chronic stimuli in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289(1):H466-476.
  42. De Windt LJ, Lim HW, Bueno OF, Liang Q, Delling U, Braz JC, Glascov BJ, Kimball TF, del Monte F, Hajjar RJ, Molkentin JD. Targeted inhibition of calcineurin attenuates cardiac hypertrophy in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(6):3322-3327.
  43. Hansson GK. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. *N Engl J Med*. 2005;352(16):1685-1695.
  44. Kim J, Ahn S, Ren XR, Whalen EJ, Reiter E, Wei H, Lefkowitz RJ. Functional antagonism of different G protein-coupled receptor kinases for beta-arrestin-mediated angiotensin II receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(5):1442-1447.
  45. Galasso G, Schiekofer S, Sato K, Shibata R, Handy DE, Ouchi N, Leopold JA, Loscalzo J, Walsh K. Impaired angiogenesis in glutathione

peroxidase-1-deficient mice is associated with endothelial progenitor cell dysfunction. *Circ Res*. 2006;98(2):254-261.

46. Iaccarino G, Keys JR, Rapacciuolo A, Shotwell KF, Lefkowitz RJ, Rockman HA, Koch WJ. Regulation of myocardial betaARK1 expression in catecholamine-induced cardiac hypertrophy in transgenic mice overexpressing alpha1B-adrenergic receptors. *J Am Coll Cardiol*. 2001;38(2):534-540.

47. Jimenez-Sainz MC, Murga C, Kavelaars A, Jurado-Pueyo M, Krakstad BF, Heijnen CJ, Mayor F, Jr., Aragay AM. G protein-coupled receptor kinase 2 negatively regulates chemokine signaling at a level downstream from G protein subunits. *Mol Biol Cell*. 2006;17(1):25-31.

48. Liu S, Premont RT, Kontos CD, Zhu S, Rockey DC. A crucial role for GRK2 in regulation of endothelial cell nitric oxide synthase function in portal hypertension. *Nat Med*. 2005;11(9):952-958.

49. Naga Prasad SV, Barak LS, Rapacciuolo A, Caron MG, Rockman HA. Agonist-dependent recruitment of phosphoinositide 3-kinase to the membrane by beta-adrenergic receptor kinase 1. A role in receptor sequestration. *J Biol Chem*. 2001;276(22):18953-18959.

50. Arraes SM, Freitas MS, da Silva SV, de Paula Neto HA, Alves-Filho JC, Auxiliadora Martins M, Basile-Filho A, Tavares-Murta BM, Barja-Fidalgo C, Cunha FQ. Impaired neutrophil chemotaxis in sepsis associates with GRK expression and inhibition of actin assembly and tyrosine phosphorylation. *Blood*. 2006;108(9):2906-2913.

51. Vroon A, Heijnen CJ, Kavelaars A. GRKs and arrestins: regulators of migration and inflammation. *J Leukoc Biol*. 2006;80(6):1214-1221.

52. Ishizaka N, Alexander RW, Laursen JB, Kai H, Fukui T, Oppermann M, Lefkowitz RJ, Lyons PR, Griendling KK. G protein-coupled receptor kinase 5 in cultured vascular smooth muscle cells and rat aorta. Regulation by angiotensin II and hypertension. *J Biol Chem*. 1997;272(51):32482-32488.

53. Shibata A, Nagaya T, Imai T, Funahashi H, Nakao A, Seo H. Inhibition of NF-kappaB activity decreases the VEGF mRNA expression in MDA-MB-231 breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat*. 2002;73(3):237-243.

54. Gump JM, Dowdy SF. TAT transduction: the molecular mechanism and therapeutic prospects. *Trends Mol Med*. 2007;13(10):443-448.

55. Snyder EL, Dowdy SF. Recent advances in the use of protein transduction domains for the delivery of peptides, proteins and nucleic acids in vivo. *Expert opinion on drug delivery*. 2005;2(1):43-51.

56. Wadia JS, Dowdy SF. Transmembrane delivery of protein and peptide drugs by TAT-mediated transduction in the treatment of cancer. *Advanced drug delivery reviews*. 2005;57(4):579-596.

57. Gupta S, Young D, Sen S. Inhibition of NF-kappaB induces regression of cardiac hypertrophy, independent of blood pressure control, in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2005;289(1):H20-29.

## LEGENDE

**Figura 1: L'effetto di GRK5 sul signaling di NFκB in BAEC.** **A)** GRK5 è stato overespresso in BAEC mediante trasfezione transiente. I livelli di IκBα e GRK5 sono stati valutati in estratti totali, citosolici e nucleari mediante western blot. Actina e H3 sono stati utilizzati come controlli. L'overespressione di GRK5 determina un aumento dei livelli totali e nucleari di IκBα **B)** I livelli di GRK5 e IκBα sono stati valutati in estratti totali e nucleari a diversi tempi dalla trasfezione di GRK5 (0, 12, 24, 36, 48 ore). L'aumento di espressione di GRK5 nel tempo determina un graduale aumento di IκBα a cui si associa una diminuzione dell'attività di NFκB (\*  $p < 0.05$ ). **C)** In estratti totali di HEK293 sono stati valutati gli effetti dell'overespressione e del silenziamento di GRK5 mediante western blot. L'overespressione di GRK5 determina un aumento dei livelli totali di IκBα mentre il silenziamento all'opposto ne facilita la degradazione (\*  $p < 0.05$ ). **D)** Per verificare se l'attività catalitica di GRK5 fosse necessaria nella regolazione di NFκB abbiamo valutato l'effetto dell'overespressione di un dominante negativo di GRK5 (K215R). Quest'ultimo ha gli stessi effetti di GRK5-WT nell'indurre accumulo nucleare di IκBα e NFκB (\*  $p < 0.05$ ).

**Figura 2: GRK5 lega IκBα.** **A)** Per valutare la capacità di GRK5 di legare il complesso IκBα /NFκB, abbiamo effettuato un immunoprecipitato utilizzando gli specifici anticorpi legati a beads di agarosio. GRK5 è in grado di legare sia IκBα che NFκB. **B)** A conferma di questi dati abbiamo ripetuto l'esperimento utilizzando le proteine purificate di GRK5, GRK2 e



MEK I (come controllo). Sia GRK5 che GRK2, ma non MEK I, sono in grado di immunoprecipitare I $\kappa$ B $\alpha$ .

**Figura 3: Il dominio RH di GRK5 è responsabile dell'effetto sul signaling di NF $\kappa$ B.** **A)** Per identificare la regione di GRK5 che interagisce con I $\kappa$ B $\alpha$ , abbiamo generato dei mini-geni di GRK5, taggati con myc e istidina (Fig. 3A): GRK5-WT (1-590 aa), GRK5-NT (1-176 aa), GRK5-RH (50-176 aa) e GRK5-CT (176-590 aa). **B)** I cloni generati sono stati trasfettati nelle BAEC e precipitati con istidina per verificare il dominio di GRK5 che lega I $\kappa$ B $\alpha$ . GRK5-WT, -NT e -RH, ma non -CT, sono tutti in grado di co-precipitare I $\kappa$ B $\alpha$ . **C-E)** L'overespressione di GRK5-RH in BAEC aumenta i livelli totali (C) e nucleari di I $\kappa$ B $\alpha$  (D) e questo si associa ad una inibizione dell'attività trascrizionale di NF $\kappa$ B (E), valutata mediante EMSA. **F)** Per poter identificare il dominio di I $\kappa$ B $\alpha$  che interagisce con GRK5, abbiamo clonato la forma mutata di I $\kappa$ B $\alpha$  che è priva del dominio amino-terminale, e abbiamo valutato la sua capacità di co-immunoprecipitare con GRK5. I $\kappa$ B $\alpha$ -WT co-immunoprecipita con GRK5 mentre I $\kappa$ B $\alpha$ -CT non lega GRK5. Entrambi i mutanti di I $\kappa$ B $\alpha$  legano NF $\kappa$ B.

**Figura 4: L'effetto di GRK5-RH su fenotipi NF $\kappa$ B-dipendenti.** Abbiamo studiato gli effetti biologici di questo nuovo meccanismo di regolazione dell'attività di NF $\kappa$ B. **A)** Abbiamo valutato l'abilità di GRK5-RH di regolare l'espressione di citochine, in particolare TNF $\alpha$ , mediante Real Time PCR. GRK5-RH inibisce l'espressione genica di TNF $\alpha$  indotta dalla stimolazione con LPS (\*  $p < 0.05$ ). **B-C)** Abbiamo valutato l'effetto di

GRK5-RH sull'apoptosi, fenomeno che dipende da NF $\kappa$ B. L'overespressione di GRK5-RH aumenta i livelli di caspasi 3 clivata, marker di apoptosi. Questo dato è stato confermato mediante analisi dell'apoptosi in fluorescenza (C) utilizzando Annessina V come target (\*  $p < 0.05$ ). **D-E**) Abbiamo studiato gli effetti di GRK5-RH sulla migrazione cellulare, utilizzando un cell monolayer-wounding assay, e sulla angiogenesi in vitro. L'overespressione di GRK5-RH nelle BAEC inibisce la migrazione cellulare (D) e la formazione di nuovi vasi su matrice extracellulare di matrigel (E) (\*  $p < 0.05$ ).

**Figura 5: L'effetto di GRK5-NT in KAT-4.** **A)** In cellule tumorali KAT4 abbiamo determinato l'overespressione di GRK5-NT mediante infezione con adenovirus. AdGRK5-NT induce localizzazione nucleare di I $\kappa$ B $\alpha$ . **B-C)** L'effetto più rilevante dell'aumentata attività di NF $\kappa$ B nel tumore è il blocco dei processi apoptotici. Abbiamo quindi valutato l'apoptosi nelle cellule KAT4 in cui abbiamo overespresso GRK5-NT. AdGRK5-NT causa un aumento dei livelli di caspasi 3 clivata (B), valutata mediante western blot e di Annessina V sulla membrana cellulare (C), valutata mediante analisi in fluorescenza. **D)** Questo si associa ad una inibizione dell'attività di NF $\kappa$ B che abbiamo valutato mediante saggio di luciferasi (\* $p < 0.05$ ).

**Figura 6: L'effetto del trattamento con l'adenovirus AdGRK5-NT sulla crescita tumorale.** Per validare i dati ottenuti *in vitro*, abbiamo studiato gli effetti di GRK5-NT in un modello patologico *in vivo*. **A)** In topi nudi (BALB/c) di circa 6 settimane è stata inoculata sottocute una sospensione cellulare di circa 2,5 milioni di cellule di carcinoma anaplastico della tiroide

(KAT4). Dopo 10 giorni dall'iniezione, abbiamo iniziato il trattamento del tumore con basse ed alte dosi dell'adenovirus codificante GRK-NT. AdGRK5-NT è in grado di rallentare la crescita del tumore in maniera dose-dipendente. **B)** Al termine del trattamento i tumori sono stati prelevati ed omogenati nel buffer RIPA/SDS per l'analisi biochimica. L'espressione di GRK5-NT nelle cellule tumorali è evidenziata mediante analisi in fluorescenza, in sezioni di tessuto incluso in paraffina. L'espressione dell'adenovirus di controllo è valutata mediante colorazione con X-GAL. **C)** Nei campioni omogenati sono stati valutati i livelli totali di  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  e caspasi 3 clivata mediante western blot. AdGRK5-NT causa un accumulo di  $\text{I}\kappa\text{B}$ , una diminuzione dei livelli di espressione del VEGF e un aumento di caspasi 3 clivata. **D)** L'attività di  $\text{NF}\kappa\text{B}$  è stata valutata nei tumori mediante saggio EMSA. Il trattamento con l'adenovirus inibisce la capacità di  $\text{NF}\kappa\text{B}$  di legare il DNA.

**Figura 7: L'effetto del trattamento con la proteina ricombinante TAT-RH sul signaling di  $\text{NF}\kappa\text{B}$ .** **A-B)** Al fine di ridurre i livelli di tossicità che possono essere prodotti dal trattamento con l'adenovirus, abbiamo clonato il minigene che corrisponde alla regione RH di GRK5 (A) e purificato la proteina RH (B) così come è descritto nei Metodi. **C)** TAT-RH è stata aggiunta al mezzo di coltura e l'espressione della proteina ricombinante nelle cellule è stata valutata mediante western blot utilizzando un anticorpo per il tag HA. **D-E)** Abbiamo testato l'efficacia di azione della proteina TAT RH, analizzando *in vitro*, in cellule KAT4, i livelli totali di  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  e gli effetti pro-apoptotici, mediante western blot. L'aggiunta della proteina ricombinante al mezzo di coltura determina aumento dei livelli di  $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$  e

caspasi 3 clivata (D). L'effetto di TAT-RH sull'apoptosi è stato confermato mediante colorazione di Annessina V in fluorescenza (E).

**Figura 8: L'effetto di TAT-RH sulla crescita tumorale** Abbiamo testato gli effetti della proteina *in vivo*. **A)** Gli animali sono stati sottoposti ad iniezione intra-tumore di 200 µg di proteina purificata (2 iniezioni/settimana per 4 settimane). Il trattamento è in grado di riprodurre gli stessi effetti indotti dal trattamento con alte dosi di AdGRK5-NT. **B)** I tumori prelevati al termine del trattamento sono stati utilizzati per l'analisi biochimica. Anche TAT-RH, come AdGRK5-NT, è in grado di aumentare i livelli di IκBα e caspasi 3 clivata, e ridurre l'espressione di VEGF, analizzati mediante western blot. **C)** Tutto questo si associa ad una riduzione dell'attività trascrizionale di NFκB, valutata mediante EMSA.

**Figura 9: L'effetto di GRK5-NT sull'ipertrofia cardiaca *in vitro*.** **A)** Abbiamo valutato *in vitro* l'effetto di GRK5-NT, che comprende il dominio RH, sulla regolazione del signaling e dell'attività trascrizionale di NFκB in cardiomioblasti in coltura (H9C2). Le H9C2 sono state infettate con AdGRK5-NT o AdLac-Z (come controllo) per 24 ore. In queste cellule, AdGRK5-NT determina un aumento dei livelli totali di IκBα, valutati mediante western blot (\* p<0.05). **B)** L'effetto di GRK5-NT sull'attività di NFκB è stato valutato mediante saggio di luciferasi. PE aumenta l'attività trascrizionale di NFκB e l'overespressione di GRK5-NT riduce questo effetto sia in condizioni basali che dopo stimolazione con PE (\* p<0.05 vs CTRL, # p<0.05 vs PE). **C)** Per valutare la capacità di GRK5-NT di regolare l'ipertrofia *in vitro*, abbiamo effettuato un saggio di luciferasi per il

promotore dell'ANF. GRK5-NT inibisce l'attività del promotore dell'ANF indotta da PE (\*  $p<0.05$  vs CTRL, #  $p<0.05$  vs PE).

**Figura 10: L'effetto di GRK5-NT sull'ipertrofia cardiaca *in vivo* in SHR. Studio *in vivo* in ratti SHR A-D)** Per gli esperimenti *in vivo* abbiamo utilizzato come modello animale i ratti SHR, nei quali l'ipertrofia ventricolare sinistra (LVH) è indotta dall'ipertensione. AdGRK5-NT o AdLac-Z sono stati iniettati nella parete cardiaca di questi animali e LVH è stata valutata dopo 4 settimane dall'iniezione, mediante ecocardiografia. Il trattamento con AdGRK5-NT riduce lo spessore del setto interventricolare (IVS) e della parete posteriore(PW) (A), LVM/BW (B) e il rapporto HW/BW (Figure C). LVEF e LVFS, che sono diminuite nei ratti SHR di controllo rispetto ai WKY, ritornano ai livelli dei ratti normotesi negli animali trattati con AdGRK5-NT (D) (\*  $p<0.05$  vs CTRL, #  $p<0.05$  vs PE).

**E)** L'analisi biochimica conferma la riduzione di LVH. Abbiamo infatti valutato l'espressione di un gene marcatore di ipertrofia, ANF, e di infiammazione,  $TNF\alpha$  mediante Real Time PCR. Dopo 1 settimana dall'inizio del trattamento l'espressione dell'ANF è significativamente ridotta nel cuore di ratti trattati con AdGRK5-NT e dopo 4 settimane si osserva un'ulteriore riduzione. Lo stesso risultato è ottenuto per il  $TNF\alpha$  (\*  $p<0.05$ ).

**F)** Per escludere la possibilità che l'ipertensione sia coinvolta in questo fenomeno, abbiamo misurato i livelli di pressione arteriosa (PA) in questi animali al termine dello studio, mediante metodica Millar. PA è sorprendentemente aumentata nei ratti trattati con AdGRK5-NT rispetto ai controlli (\*  $p<0.05$  vs CTRL, #  $p<0.05$  vs PE).

**Figura 11: L'effetto di GRK5-NT sull'ipertrofia cardiaca *ex vivo* in SHR.** **A)** A 1 e 4 settimane dall'iniezione, i cuori sono stati prelevati e l'espressione di AdGRK5-NT è stata valutata mediante analisi istologica. GRK5-NT è espresso omogeneamente nel cuore ad 1 settimana di trattamento e, sebbene ridotto, è ancora presente a 4 settimane come mostrato dai risultati dell'immunoistochimica e dell'immunofluorescenza. **B)** Nelle stesse sezioni paraffinate di cuore abbiamo valutato l'ipertrofia dei cardiomiociti, mediante l'utilizzo di un software "Image J" e la fibrosi, mediante colorazione tricromia di Masson per colorare in verde le fibre di collagene. Sia le dimensioni dei cardiomiociti che la fibrosi sono ridotte dal trattamento con AdGRK5-NT (\* $p < 0.05$ ). **C-D)** A conferma dei dati *in vivo*, abbiamo analizzato *ex vivo* l'effetto del trattamento con GRK5-NT sul signaling di NF $\kappa$ B nei cuori dei ratti SHR. In estratti cellulari totali, i livelli di I $\kappa$ B $\alpha$  sono aumentati dal trattamento con AdGRK5-NT rispetto ai controlli trattati con AdLac-Z mentre diminuiscono i livelli di caspasi 3 clivata (C). A questo si associa una localizzazione nucleare sia di I $\kappa$ B che NF $\kappa$ B, con una riduzione della forma fosforilata e quindi attiva di NF $\kappa$ B (D) (\*  $p < 0.05$ ). **E)** Abbiamo quindi valutato l'attività trascrizionale di NF $\kappa$ B mediante EMSA, che risulta diminuita in maniera tempo-dipendente negli animali trattati con AdGRK5-NT. OCT-1 è stato utilizzato come controllo.

**Figura 12: L'effetto di GRK5-NT sull'ipertrofia cardiaca *in vivo* in WKY** **A-C)** Abbiamo poi verificato se AdGRK5-NT fosse in grado di prevenire lo sviluppo dell'ipertrofia cardiaca in ratti WKY nei quali l'ipertrofia è indotta mediante stimolazione cronica con PE (14 giorni tramite pompa osmotica impiantata sottocute) dopo essere stati trattati con

AdGRK5-NT o AdLac-Z. Il rimodellamento cardiaco è stato valutato mediante analisi ecocardiografica una volta a settimana per due settimane. AdGRK5-NT previene in maniera significativa lo sviluppo di LVH indotta da PE, come dimostrato dalla riduzione di IVS (A), LVM/BW (B) e HW/BW (C) (\*  $p < 0.05$  vs CTRL, #  $p < 0.05$  vs PE). **D)** Questo si associa anche ad una riduzione dell'espressione genica dell'ANF, valutata mediante Real Time PCR (\*  $p < 0.05$  vs CTRL, #  $p < 0.05$  vs PE).

FIGURA 1

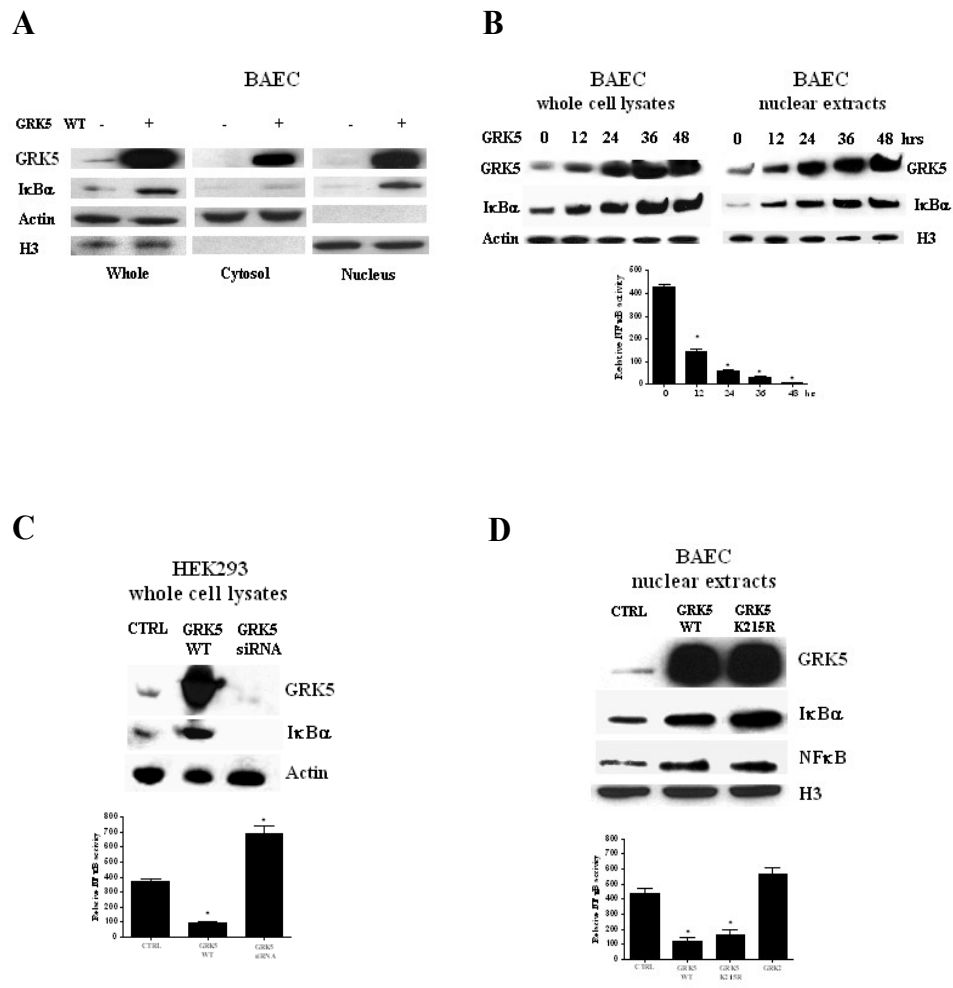




FIGURA 2

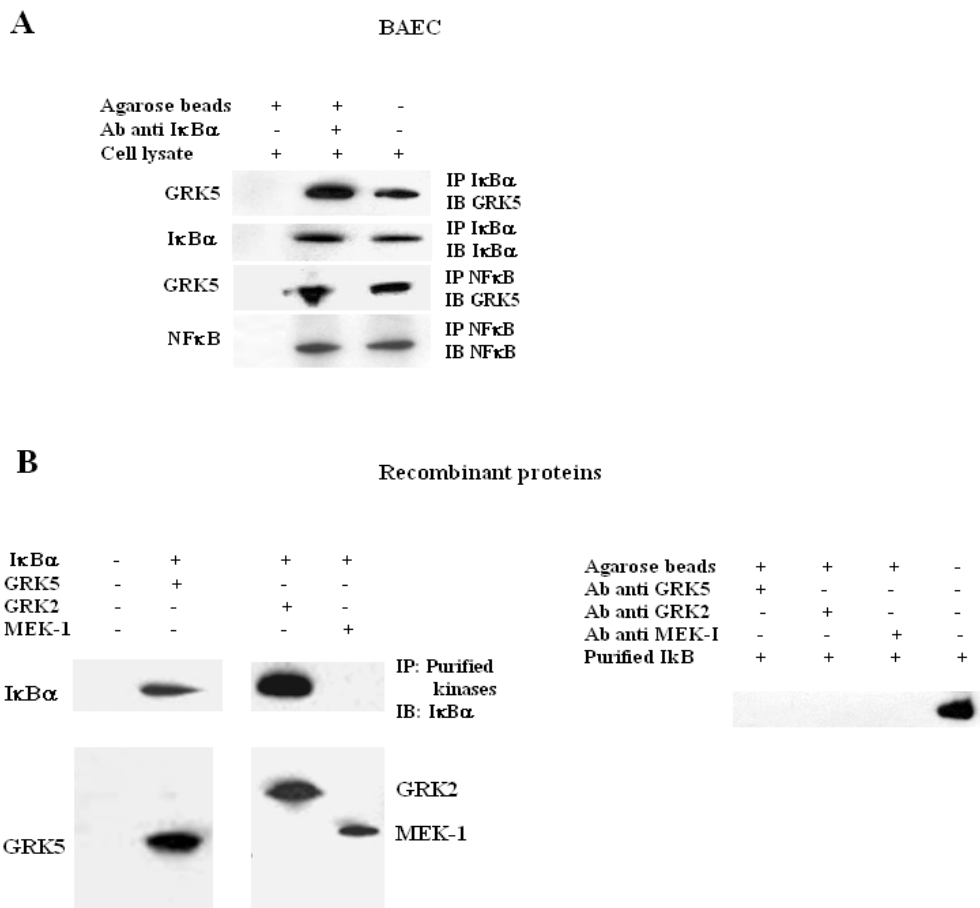
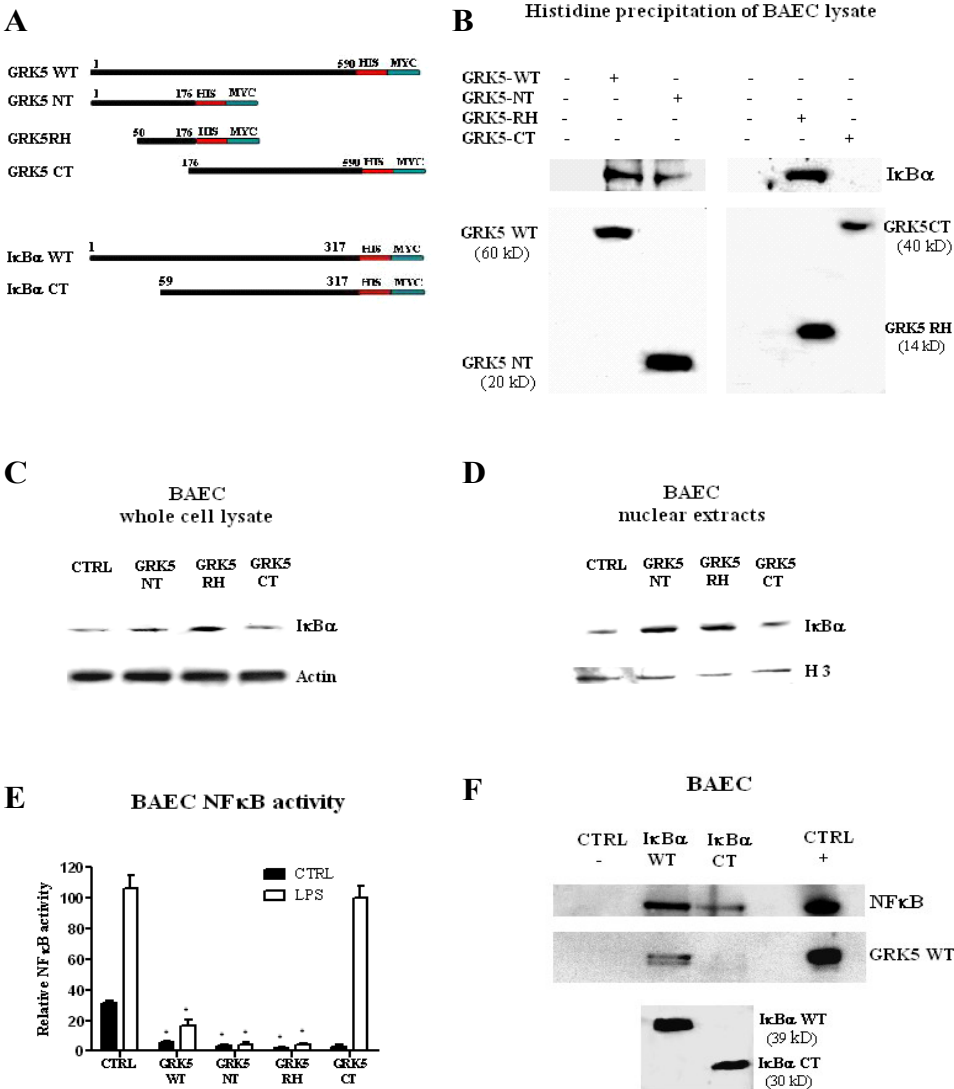
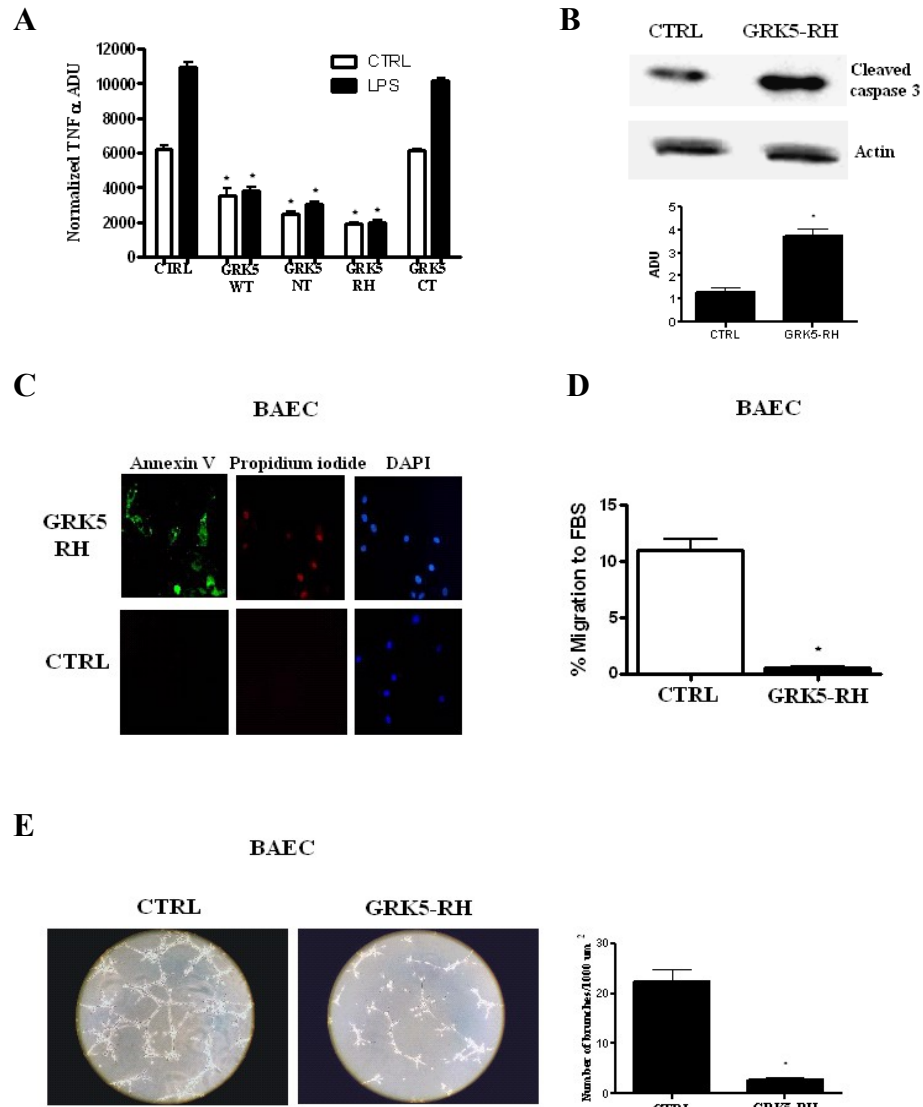


FIGURA 3

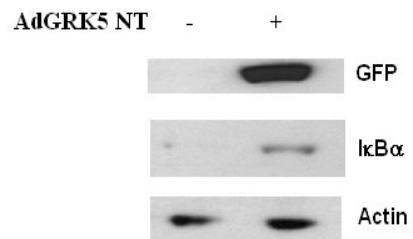


**FIGURA 4**

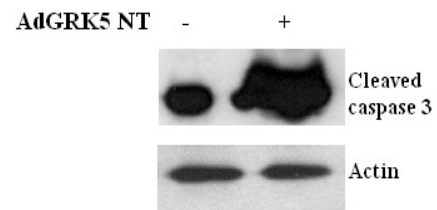


**FIGURA 5**

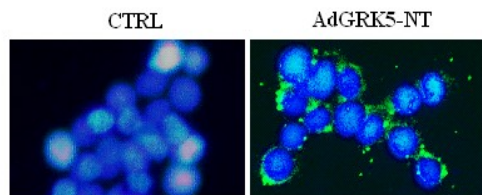
**A**



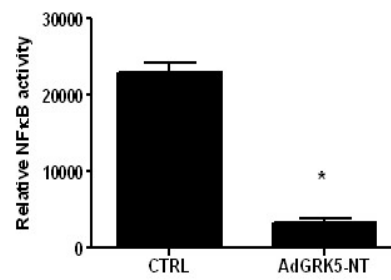
**B**



**C**



**D**



**FIGURA 6**

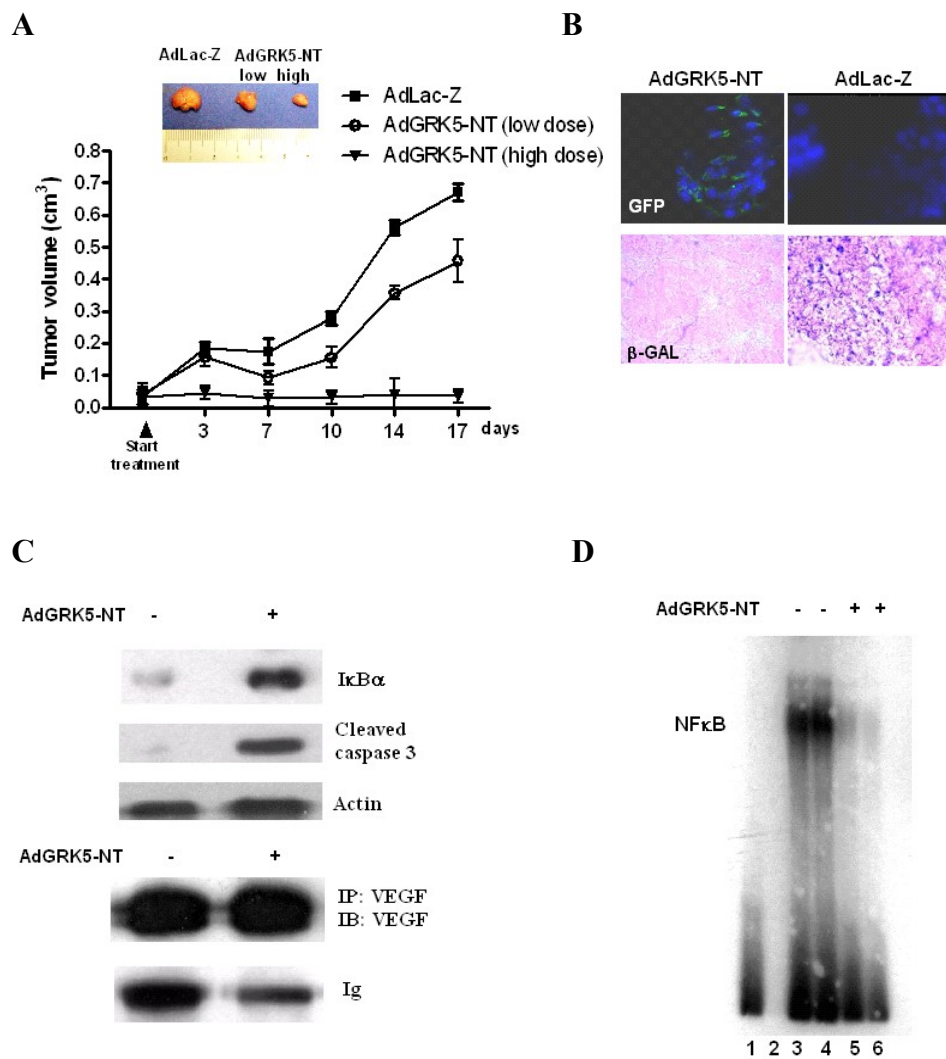
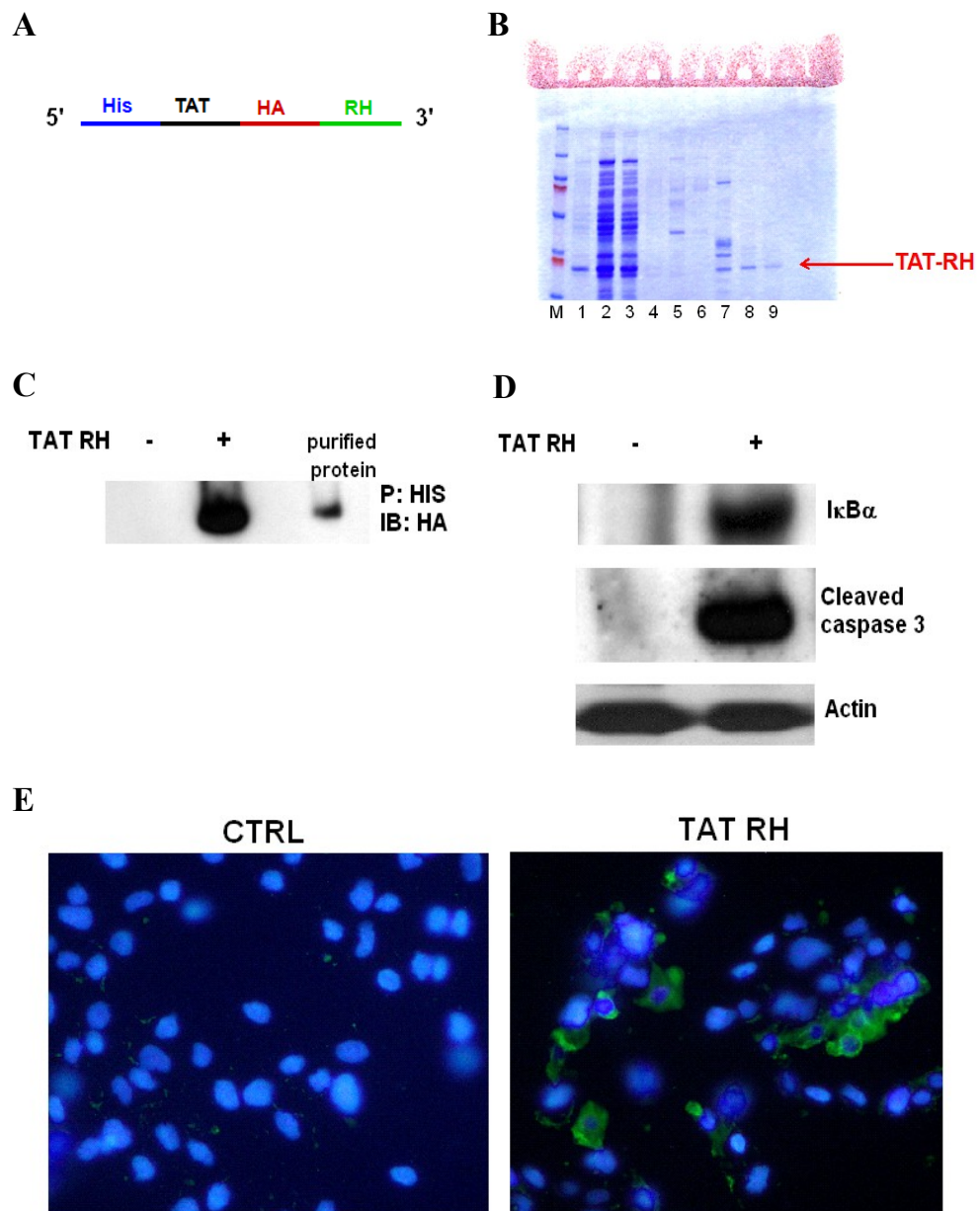


FIGURA 7



**FIGURA 8**

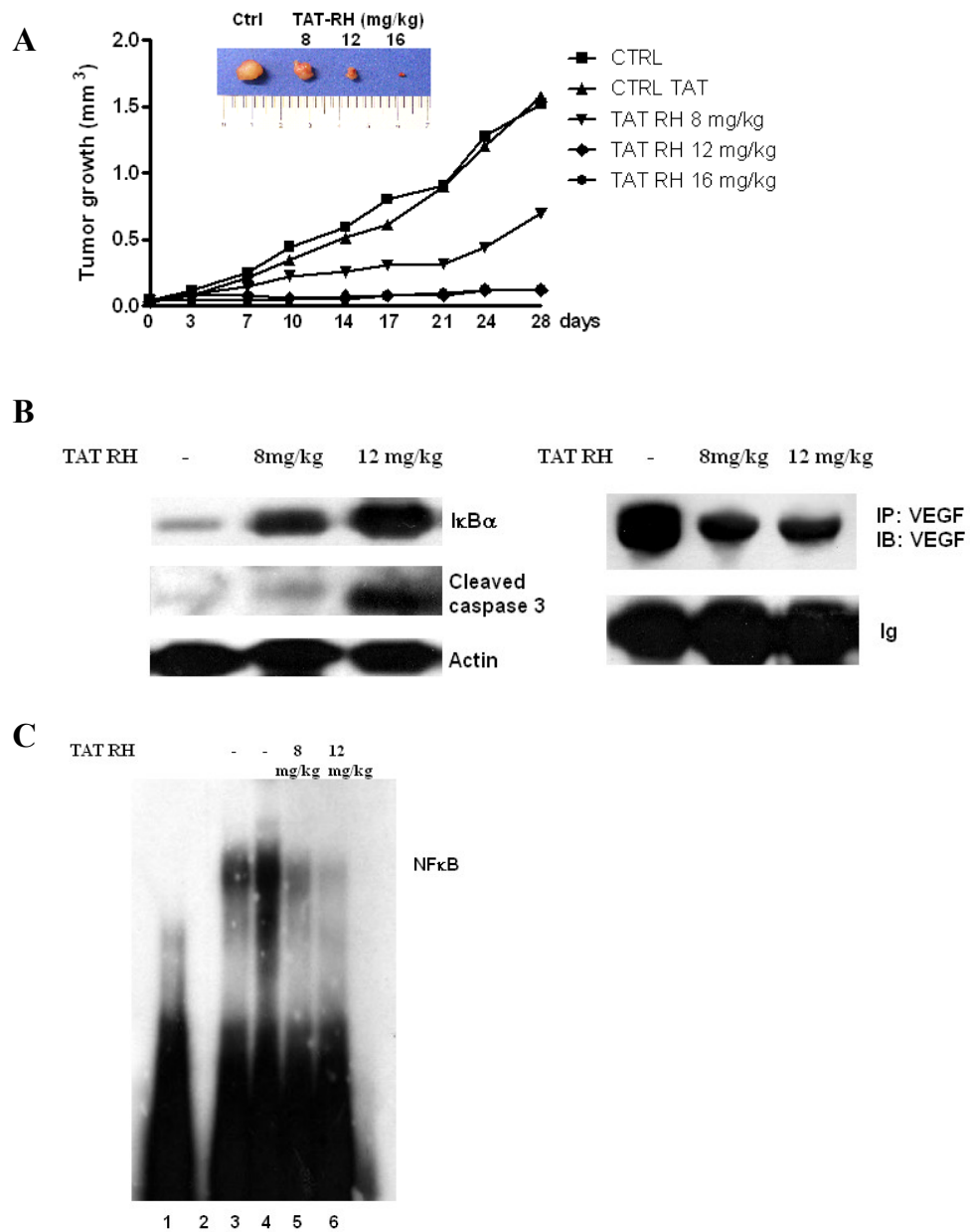
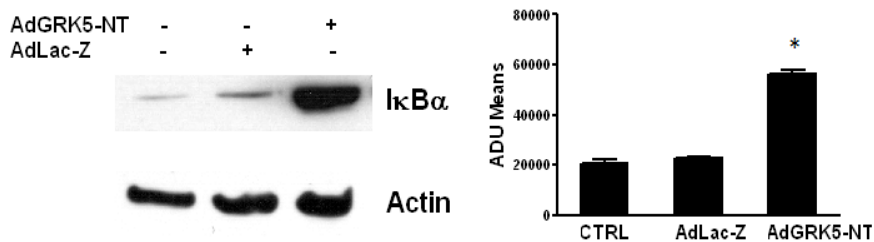
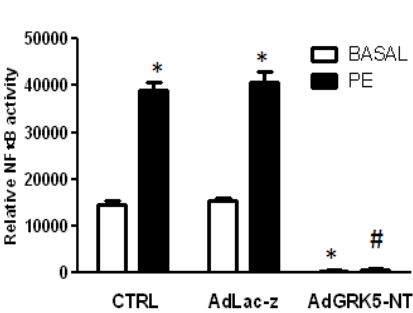


FIGURA 9

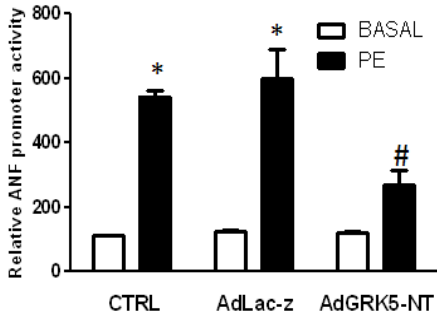
A



B



C





**FIGURA 10**

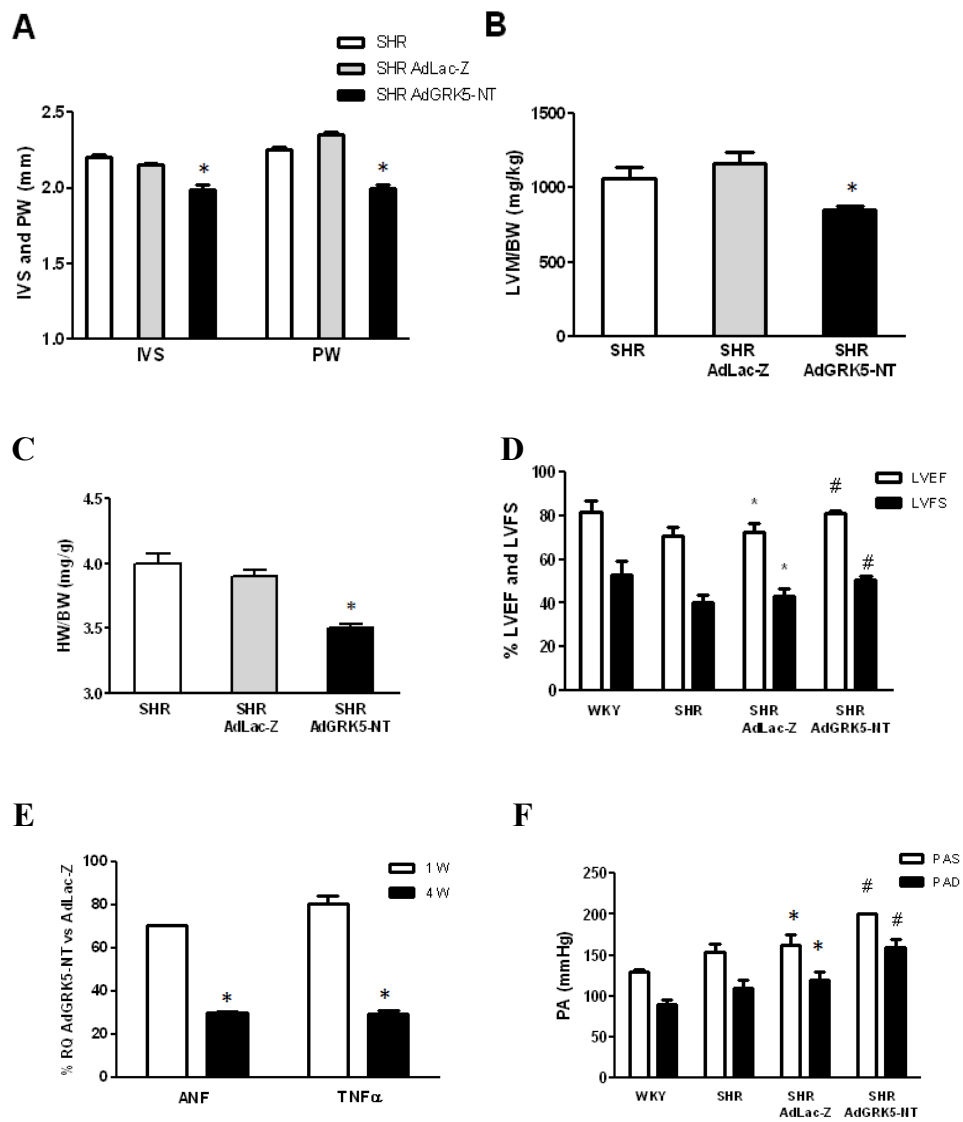
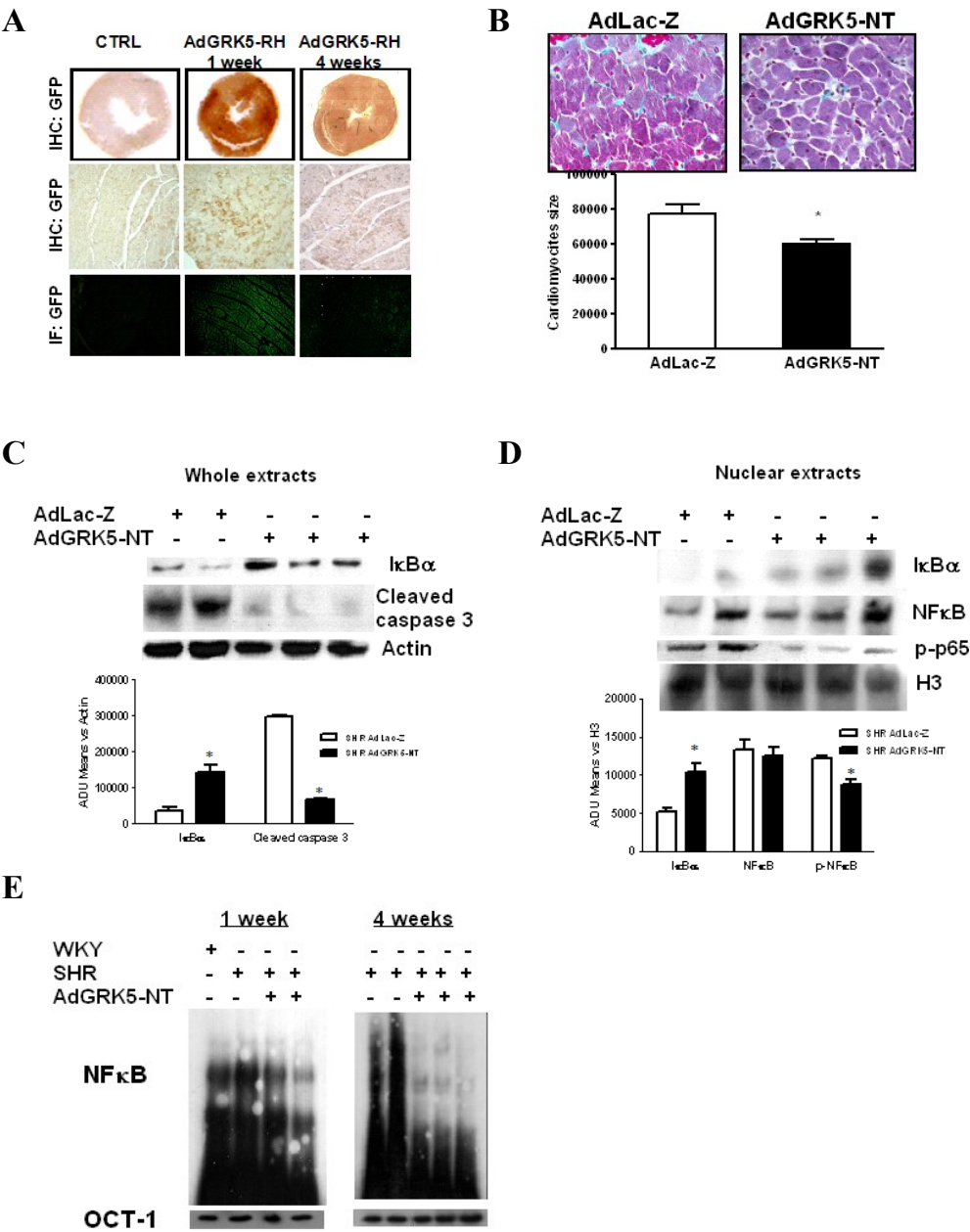
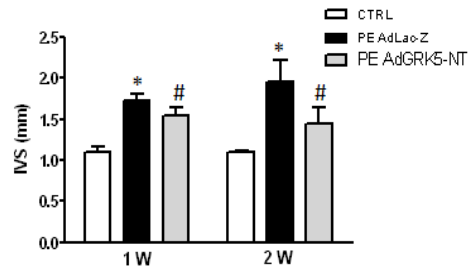


FIGURA 11

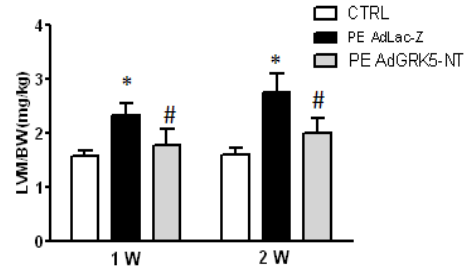


**FIGURA 12**

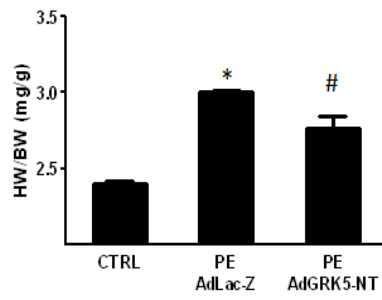
**A**



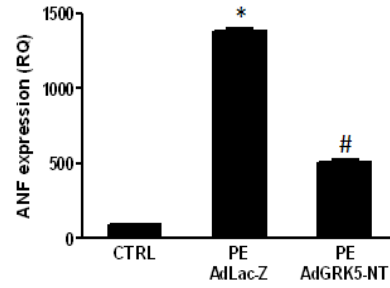
**B**



**C**



**D**



**Tabella I: Primers per i clonaggi**

|         |   |
|---------|---|
| GRK5-WT | 5'TAAGCTTGGATGGAGCTGGAAAACA3'<br>3'GCCTTCGAGATCTCCC5'               |
| GRK5-NT | 5'TAAGCTTGGATGGAGCTGGAAAACA3'<br>5'TTCCGTTGGCAGATCTCCC3'            |
| GRK5-RH | 5'TAAGCTTGGATGCGAGATTACTGCA3'<br>5'AGCGAAAGAGAGATCTCCC3'            |
| GRK5-CT | 5'TAAGCTTGGATGAGGAACATGAATTT<br>5'GCCTTCGTCGAGATCTCCC3'             |
| IκBα WT | 5'TAAGCTTGGATGTTCCAGGCGGCCGA3'<br>5' CCCTCTAGATAACGTCAGACGCT3'      |
| IκBα-CT | 5'TAAGCTTGATGTCGGAGCCCTGGAAG3'<br>5' CCCTCTAGATAACGTCAGACGCT3'      |
| TAT-RH  | 5'CCCCATGGCCCGAGATTACTGCAGTA3'<br>5'ATAAACTAGCGAAAGAGATCCCATGGGGG3' |

**Tabella II: Primers per Real Time PCR**

|              |  |
|--------------|--|
| TNF $\alpha$ | 5'CCAGGAGAAAGTCAGCCTCCT3'<br>5'CGATAAAGGGGTCAGAGTAAT3'                           |
| VEGF         | 5'CAGGCTGTCGTAACGATGAA3'<br>5'TTTCTTGCGCTTTCGTTTTT3'                             |
| ANF          | 5'CGTGCCCCGACCCACGCCAGCATGGGCTC<br>C3'<br>5'GGCTCCGAGGGCCAGCGAGCAGAGCCCT<br>CA3' |
| GAPDH        | 5'AGTATGTCGTGGAGTCTACT3'<br>5'TGTGG TCATGAGCCCTTCCAC3'                           |
| MYC          | 5'CTCTTCTGAGATGAGTTTTTG TTC3'<br>(reverse)                                       |